

Untersuchung der Motilität
von Spermien einiger Haustierarten
mit einem
Computer-Videomikrographie-Verfahren

Iris Schröppel

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0095

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Lehrstuhl: Prof. Dr. W. Leidl

Untersuchung der Motilität von Spermien
einiger Haustierarten mit einem
Computer-Videomikrographie-Verfahren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Iris Schröppel
aus
Bayreuth

1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. M. Rüsse
Referent:	Prof. Dr. W. Leidl
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. F. Bakels

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

Meinen lieben

Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literatur	2
2.1. Computergesteuerte Messung der Motilität von Spermien	2
2.2. Messung der Spermienmotilität bei den einzelnen Tierarten	5
2.2.1. Bulle	5
2.2.2. Schafbock	6
2.2.3. Hengst	7
2.2.4. Eber	8
2.3. Meßgenauigkeit objektiver Auswertungssysteme	8
2.4. Beeinflussung der Spermienmotilität durch exogene Faktoren	9
2.4.1. Temperatur	9
2.4.2. Tiefgefrierkonservierung	11
2.4.3. pH - Wert und Flüssigkonservierung	12
3. Material und Methoden	14
3.1. Gewinnung der Ejakulate	14
3.2. Untersuchung der Ejakulate	14
3.3. Verdünnung der Ejakulate	15
3.4. Computergesteuerte Videomikrographie	16

	Seite
3.4.1. Geräteanordnung	16
3.4.2. Aufnahme der Proben auf Videoband	17
3.4.3. Meßprinzip des Bildanalyse-Computers	17
3.5. Anwendbarkeit des Verfahrens bei verschiedenen Tierarten	20
3.6. Überprüfung der Meßgenauigkeit	20
3.7. Einfluß der Temperatur	21
3.8. Einfluß des Tiefgefrierens	22
3.9. Einfluß des pH-Wertes auf die Flüssigkonservierung	23
3.10. Statistische Methoden	24
4. Ergebnisse	25
4.1. Anwendbarkeit des Systems bei verschiedenen Spezies	25
4.2. Überprüfung der Meßgenauigkeit	39
4.3. Einfluß der Temperatur	33
4.3.1. Bulle	33
4.3.2. Schafbock	35
4.3.3. Ziegenbock	37
4.3.4. Hengst	39
4.3.5. Eber	41
4.3.6. Tierartlicher Vergleich	43
4.4. Einfluß des Tiefgefrierens	46

III

	Seite
4.5. Einfluß von pH-Wert und Flüssigkonservierung	48
4.5.1. Bulle	48
4.5.2. Schafbock	50
4.5.3. Ziegenbock	52
4.5.4. Hengst	54
4.5.5. Eber	56
4.5.6. Tierartlicher Vergleich	58
5. Diskussion	61
6. Zusammenfassung	70
7. Summary	72
8. Literaturverzeichnis	74

1. Einleitung

Bei der Samenuntersuchung nimmt die Bestimmung der Spermienmotilität eine zentrale Stellung ein. Die bislang übliche Schätzung des Anteils vorwärtsbeweglicher Samenzellen im mikroskopischen Bild weist zwei wesentliche Nachteile auf. Einmal bleiben die Bewegungsform und die Geschwindigkeit der Spermien, die für die Qualität eines Ejakulates von großer Bedeutung sein können, unberücksichtigt. Zum anderen ist wiederholt nachgewiesen worden, daß die Subjektivität des Untersuchers die Beurteilung einer Spermaprobe sehr stark beeinflußt und es deshalb zu erheblichen Abweichungen zwischen den Befunden einzelner Untersucher kommen kann.

Viele Methoden wurden entwickelt, um die Aussage über die Beweglichkeit von Spermien zu objektivieren und zu erweitern. Eine dieser Methoden, die computergesteuerte Videomikrographie, wurde in dieser Arbeit auf ihre Anwendbarkeit bei Samenproben verschiedener Haussäugetiere überprüft.

Besonderer Wert wurde dabei auf die tierartlich unterschiedliche Bewegung der Spermien sowie deren Beeinflussung durch äußere Faktoren, wie Temperatur, Tiefgefrieren, pH - Wert und Lagerung, gelegt.

2. Literatur

2.1. Computergesteuerte Messung der Motilität von Spermien

Versuche, den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien eines Ejakulates objektiv zu bestimmen, beruhen auf verschiedenen Techniken. So kann die Spermienmotilität indirekt gemessen werden, indem man die Streuung gebündelten Lichtes (COOKE and HALLETT, 1976) oder von Laserstrahlen (JOUANNET et al., 1977; WALL et al., 1980; ROSS et al., 1983) durch sich bewegende Samenzellen als Parameter für die Motilität in einer Samenprobe nimmt. Eine andere Möglichkeit ist die Film- oder Videoaufnahme von Spermaproben durch eine auf ein Mikroskop montierte Kamera und die sich daran anschließende direkte Auswertung der Spermienbahnen. Da das Vermessen der Bahnen "per Hand" (KATZ und DOTT, 1975; RIEMKE, 1984) ein sehr zeitaufwendiger Prozeß war, wurde versucht, die Bildauswertung durch Einsatz eines Computers zu beschleunigen.

Die erste Computerauswertung dieser Art führten JECHT und RUSSO (1973) an Humansperma durch. Sie stellten für die nachfolgende Entwicklung richtungsweisende Forderungen auf:

1. Eine objektive Messung der Spermiedichte.
2. Die Auswertung aller beweglichen Spermien mit Berücksichtigung ihrer Geschwindigkeit und der Art ihrer Bewegung.
3. Die Angabe der durchschnittlichen Geschwindigkeit aller beweglichen Spermien.
4. Die Bestimmung des Prozentsatzes unbeweglicher Spermien.

5. Die Einteilung der beweglichen Spermien in Bewegungsklassen aufgrund der Länge ihrer zurückgelegten Bahnen.
6. Das Vermeiden äußerer Einflüsse oder einer Veränderung des Milieus während der Messung.

LIU und WARME (1977) filmten verdünntes Bullensperma und werteten den in ein Digitalbild transformierten Film per Computer aus. Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien und deren Geschwindigkeit wurden bestimmt. Die Auswertung von ca. 30 Spermien dauerte 3 Minuten, wobei jede Zelle einzeln identifiziert und ihre Daten gespeichert wurde. Dieses System wurde in anderen Arbeiten auf seine Anwendbarkeit bei Humansperma (AMANN, 1979) und die Genauigkeit seiner Auswertung (AMANN und O'CONNOR, 1980) überprüft. Die Verfolgung der Spermienbahnen über eine unterschiedliche Anzahl von Bildern beeinflusste die Ergebnisse nicht (AMANN und HAMMERSTEDT, 1980). O'CONNOR et al. (1981) verglichen die Computerauswertung mit der Schätzung des Prozentsatzes beweglicher Spermien im mikroskopischen Bild. In Proben mit schlechter Motilität war die Diskrepanz zwischen beiden Systemen hoch ($p < 0,05$). Bei einer Motilität über 50 % korrelierten beide Auswertungen hochsignifikant ($p < 0,01$). Eine halbautomatische Computerauswertung benutzten MAKLER (1980 b) und MAKLER et al. (1981). Die Spermienbahnen wurden auf einem Digitalisiertisch mit einem sensorgebenden Stift nachgezeichnet und durch den Computer vermessen. So konnte der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien und ihre durchschnittliche Geschwindigkeit bestimmt werden. Für jede Spermaprobe wurde ein Motilitätsindex angegeben, der sich aus dem

Produkt der Geschwindigkeit und dem Prozentsatz motiler Spermien errechnete. Die Auswertungszeit für eine Probe betrug 5 - 8 Minuten. KATZ und DOTT (1975) verglichen eine Auswertung per Hand mit dem Bildanalyse-Computer " Quantimet 720 ". Der " Quantimet 720 " maß die Änderung der Graustufen in einem Schwarz-Weiß-Bild, verursacht durch die Spermienbewegung. Bullenspermien bildeten sich gegenüber einem grauen Hintergrund schwarz ab. Die so ermittelte " Platzwechselfrequenz" stimmte mit der Schätzung im mikroskopischen Bild überein ($r = 0,93$; DOTT und FOSTER, 1979). SCHOEVERT-BROSSAULT (1984) benutzte das gleiche Gerät für die Messung von Humanspermien. Mit einem Videoprozessor und angeschlossenem Computer vermaßen KATZ et al. (1985) die Spermienbahnen von Mensch und Rhesusaffe. Bei der Auswertung wurden von ihnen 3 Gesichtspunkte besonders berücksichtigt:

1. Eine minimale Bewegung zur Abgrenzung der beweglichen von den unbeweglichen Spermien.
2. Ein Schwellenwert für die Geschwindigkeit zur Differenzierung Ortsbeweglicher und vorwärtsbeweglicher Spermien.
3. Die Festlegung der maximalen Ortsveränderung einer Zelle zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bildern, um Fehler durch zwei sich kreuzende Spermienbahnen zu vermeiden.

Mit dem Phasenkontrastverfahren wurden bessere Ergebnisse erzielt als mit der Dunkelfeldmikroskopie.

Ein anderes Auswertungssystem, der "Cellsoft automated semen analyzer", beruhte auf der Erkennung und Verfolgung der Spermienköpfe über eine bestimmte Bildsequenz einer Videoaufnahme. Durch

ihre Größe und ihren Grauwert wurden die Spermien identifiziert und ihre Bewegungsbahn über 6 Bilder einander zugeordnet. Der Computer maß dabei den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien und ihre Geschwindigkeit. Ab einer Geschwindigkeit von 10 $\mu\text{m}/\text{sec}$ galten die Spermien als vorwärtsbeweglich (MATHUR et al., 1986).

2.2. Messung der Spermienmotilität bei den einzelnen Tierarten

2.2.1. Bulle

Mit Hilfe einer kalibrierten Zählkammer und einer Stoppuhr bestimmten MOELLER und VAN DEMARK (1955) direkt im mikroskopischen Bild eine Durchschnittsgeschwindigkeit von 114 $\mu\text{m}/\text{sec}$. Mit der gleichen Geräteanordnung ermittelten BAKER et al. (1957) einen Prozentsatz von 32,6% unbeweglichen Zellen und eine Geschwindigkeit von 65,8 $\mu\text{m}/\text{sec}$ der vorwärtsbeweglichen Zellen in Spermaproben vom Bullen, die auf 50000 Spermien/ mm^3 verdünnt waren. Bei einer Spermienkonzentration von 25000/ mm^3 war die Geschwindigkeit mit 75 $\mu\text{m}/\text{sec}$ signifikant höher.

Wird eine verdünnte Spermaprobe mit einer auf das Mikroskop montierten Kamera gefilmt, kann die Vermessung der Spermienbahnen am Monitor "per Hand" erfolgen (KATZ und OVERSTREET, 1981). Der hierbei ermittelte Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien lag bei 74, die durchschnittliche Geschwindigkeit bei 119 $\mu\text{m}/\text{sec}$

(KATZ und OVERSTREET, 1981) bzw. bei 84% und 92,3 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (RIEMKE, 1984; RIEMKE et al., 1986).

Bei einer Auswertung von Filmaufnahmen durch einen Computer betrug der durchschnittliche Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien in frischen, verdünnten Spermaproben 67,4% mit einer Geschwindigkeit von 84,8 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (O'CONNOR et al., 1981), in aufgetautem Tiefgefriersperma 56,9% mit einer Geschwindigkeit von 83,2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (GSCHWEND, 1986). In den Untersuchungen von SAMUELS und VAN DER HORST (1986) bewegten sich aufgetaute Bullenspermien mit einer Geschwindigkeit von 64,2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ fort.

Eine andere Möglichkeit zur objektiven Bestimmung des Prozentsatzes beweglicher Spermien und deren Geschwindigkeit ist die Messung der Streuung von Licht- oder Laserstrahlen (ATHERTON, 1975; WALL et al., 1980). Mit dieser Methode wurden Geschwindigkeiten von 95 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (CRAIG et al., 1982) und 140 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (HAILETT et al., 1978) als Durchschnittswerte einer Spermaprobe gemessen.

2.2.2. Schafbock

MAYEVSKY et al. (1980) bestimmten die Massenbewegung von Schafbocksperma durch Reflexion eines gebündelten Lichtstrahles im Photometer. Die Übereinstimmung mit der mikroskopischen Schätzung war hoch ($r = 0,99$).

PHILLIPS und ANDREWS (1937) maßen die Zeit, die Spermien benötigten, um in ein spermienfreies Medium zu wandern. Die durchschnittliche Fortbewegungsgeschwindigkeit betrug $80,5 \mu\text{m}/\text{sec}$.

Aus der Frequenz und der Amplitude des Schwanzschlages errechnete SWAN (1969) Geschwindigkeiten von $67 \mu\text{m}/\text{sec}$ - $220 \mu\text{m}/\text{sec}$. Nach der gleichen Formel errechnete DENEHY (1975) eine durchschnittliche Geschwindigkeit einer Spermaprobe von $130 \mu\text{m}/\text{sec}$ und ermittelte für die gleiche Probe mit Handmessung $136 \mu\text{m}/\text{sec}$. Ebenfalls mit Handmessung maßen SCHILLING et al. (1967) im Rahmen eines Versuchs zur Trennung von X- und Y-Spermien eine durchschnittliche Fortbewegungsgeschwindigkeit von $143 \mu\text{m}/\text{sec}$ für die leichten Y-Spermien und $104 \mu\text{m}/\text{sec}$ für die schweren X-Spermien. Mit einer computergesteuerten Bildanalyse wurden Geschwindigkeiten von durchschnittlich $114 \mu\text{m}/\text{sec}$ gemessen (KATZ und DOTT, 1975).

2.2.3. Hengst

GASSNER et al. (1959) bestimmten die Motilität von Hengst-spermien, die entsprechend einem Konzentrationsgefälle zwischen 2 Kapillaren wanderten. Mit einer ähnlichen Versuchsanordnung fanden ROMBE und SPIRIDONOVA (1972) eine durchschnittliche Geschwindigkeit von $100,1 \mu\text{m}/\text{sec}$. Das Vermessen der Spermienbahnen per Hand ergab Werte von $50 \mu\text{m}/\text{sec}$ (BIELANSKI, 1975), $81 \mu\text{m}/\text{sec}$ (VAN HUFFEL, 1985), und $51,4 \mu\text{m}/\text{sec}$ (TISCHNER, 1979) als Durchschnittsgeschwindigkeit für Hengst-spermien.

2.2.4. Eber

Die Bewegungsform von Eberspermien ist kreisförmig (MÜLLER und BRANDL, 1975; WEBER et al., 1980; SHIMIZU und MATSUMOTO, 1977) oder irregulär (MASSANYI, 1977).

Die Auswertung von Filmaufnahmen erbrachte Fortbewegungsgeschwindigkeiten von 30 - 80 $\mu\text{m}/\text{sec}$, wobei Werte über 50 $\mu\text{m}/\text{sec}$ selten waren (MÜLLER und BRANDL, 1975). WEBER et al. (1980) ermittelten mit der gleichen Methode eine durchschnittliche Geschwindigkeit von 67,4 $\mu\text{m}/\text{sec}$.

2.3. Meßgenauigkeit objektiver Auswertungssysteme

Zur Überprüfung einer Messung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien kann eine Spermaprobe mit einem definierten Anteil unbeweglicher Spermien dienen (WALL et al., 1980).

Durch die Schockkühlung einer Spermaprobe in flüssigem Stickstoff wurden sämtliche Zellen abgetötet (WARNAWSKI, 1971). AMANN und HAMMERSTEDT (1980) mischten auf diese Weise inaktiviertes Sperma mit unbehandelten Samenproben in verschiedenen Verhältnissen. Die nach der direkten Auswertung der Spermienbahnen berechnete Korrelation zwischen dem Anteil beweglicher und dem Anteil unbehandelter Samenzellen betrug $r = 0,94$.

Eine andere Methode Spermien zu inaktivieren ist die Erhitzung auf ca. $+60^{\circ}\text{C}$ für 2-Minuten (MAKLER, 1980). Auch bei einer computergesteuerten Auswertung von so behandelten, in verschiedenen Verhältnissen gemischten, Spermaproben bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem berechneten Anteil und dem gemessenen Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien (BARTOOV et al., 1981).

2.4. Beeinflussung der Spermienmotilität durch exogene Faktoren

2.4.1. Temperatur

Mit sinkender Umgebungstemperatur reduziert sich die Stoffwechselrate (CHANG und WALTON, 1940) und somit die Beweglichkeit der Spermien (MÜLLER, 1968). Wurde eine Samenprobe plötzlich Temperaturen unter $+15^{\circ}\text{C}$ ausgesetzt, führte dieser Kälteschock (QUINN und WHITE, 1969) zu einer irreversiblen Hemmung der Beweglichkeit. Ein stufenweises Abkühlen hingegen senkte die Motilität der Spermien reversibel (MAKLER et al., 1981), wobei die Geschwindigkeit der Temperatursenkung entscheidend war (PROVINCE et al., 1985).

Mit Hilfe eines Stroboskopes photographierten JONDET et al. (1983) Humanspermien und vermaßen die Wegbahnen per Hand. Dabei wurde die Samenprobe Temperaturen von 0°C , $+10^{\circ}\text{C}$, $+20^{\circ}\text{C}$, $+30^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$ und $+45^{\circ}\text{C}$ ausgesetzt. Bei 0°C waren alle Spermien unbeweglich. Mit steigender Temperatur erhöhte sich die Amplitude des

Kopfschlages, erreichte ihr Maximum bei $+20^{\circ}\text{C}$, verringerte sich bis $+37^{\circ}\text{C}$ leicht, um dann bei $+45^{\circ}\text{C}$ zu sistieren. Parallel dazu erhöhte sich die Geschwindigkeit bis zu einer Temperatur von $+37^{\circ}\text{C}$ und sank danach schnell ab. Die gleiche Versuchsanordnung verwendete RIKMENSPOEL (1984) für die Untersuchung von Bullensperma in einem Temperaturbereich von $+5^{\circ}\text{C}$ - $+37^{\circ}\text{C}$. Auch hier vergrößerte sich die Amplitude proportional zur Fortbewegungsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur. Im Temperaturbereich von $+26^{\circ}\text{C}$ bis $+35^{\circ}\text{C}$ erhöhte sich der Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen nur bis zu einer Temperatur von $+32^{\circ}\text{C}$. Von $+32^{\circ}\text{C}$ bis $+35^{\circ}\text{C}$ blieb er konstant. Die Geschwindigkeit der Zellen war bei $+35^{\circ}\text{C}$ fast doppelt so hoch wie bei $+26^{\circ}\text{C}$ (WALL et al., 1980). In den Untersuchungen von PLEWINSKA-WIERZBOWSKA (1969) stieg die Geschwindigkeit von Bullenspermien linear mit einer Temperaturerhöhung bis zu $+53^{\circ}\text{C}$ und war unterhalb $+11^{\circ}\text{C}$ gleich Null. Im Sperma des Ebers wurde die beste Beweglichkeit bei $+25^{\circ}\text{C}$ gemessen (TSO et al., 1980). Bei $+5^{\circ}\text{C}$ starben Eberspermien ab (AALBERS, 1961). Den parallelen Anstieg des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien und deren Geschwindigkeit im Bereich von $+25^{\circ}\text{C}$ bis $+37^{\circ}\text{C}$ betonten JANICK und MACLEOD (1970), während MAKLER et al. (1981) auf das unterschiedliche Verhalten dieser beiden Parameter hinwiesen. In ihren Untersuchungen änderte sich der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Samenzellen zwischen $+23^{\circ}\text{C}$ und $+37^{\circ}\text{C}$ kaum, während die Geschwindigkeit bis $+37^{\circ}\text{C}$ zunahm. RIEMKE (1983) fand in seinen Untersuchungen einen linearen Anstieg der Geschwindigkeit in einem Bereich von $+21^{\circ}\text{C}$ bis $+45^{\circ}\text{C}$. Der Anteil vorwärtsbeweglicher Zellen erhöhte sich bis zu einer Temperatur von $+27^{\circ}\text{C}$

und blieb dann bis $+40^{\circ}\text{C}$ nahezu konstant. Dabei wurde für das Verhältnis der Temperatur zum Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,38$ und zwischen Temperatur und Geschwindigkeit $r = 0,94$ errechnet.

2.4.2. Tiefgefrierkonservierung

Die Tiefgefrierkonservierung reduziert sowohl die Zahl der vorwärtsbeweglichen Spermien als auch deren Fortbewegungsgeschwindigkeit, wobei der Abfall der Beweglichkeit von der Ausgangsmotilität abhängt (PAUFLER, 1974). Die beim Bullen ermittelten Werte schwankten zwischen 74% - 82,8% vor dem Einfrieren und 62% - 74,8% nach dem Auftauen, die Geschwindigkeit sank von $75,6 \mu\text{m/sec}$ auf $59,3 \mu\text{m/sec}$ (MÖLLER, 1976) oder blieb nahezu gleich (RIEMKE, 1984). TISCHNER (1979) fand bei der Untersuchung von Hengstsperma die höchsten Geschwindigkeiten nach dem Auftauen in den Proben, die auch die beste Bewegungsaktivität zeigten. Die Geschwindigkeit von Hengstspermien sank von $113,5 \mu\text{m/sec}$ vor dem Tiefgefrieren auf $80,3 \mu\text{m/sec}$ nach dem Auftauen (ROMBE und SPIRIDONOVA, 1972).

2.4.3. pH-Wert und Flüssigkonservierung

In einem pH-Bereich zwischen 6,5 und 7,5 beeinflussten pH-Schwankungen des Mediums die Motilität von Spermien wenig (LARDY und PHILLIPS, 1943; TAMPION und GIBBONS, 1963). Ein pH-Wert unter 6,5 hemmte die Beweglichkeit (NORMAN und JOHNSON, 1958) ebenso wie pH-Werte über 7,5 (BLACKSHAW, 1953). Dabei traten tierartliche Unterschiede auf:

Wiederkäuerspermien hatten ihr pH-Optimum bei pH 7,0 - 7,2 (BLACKSHAW und EMMENS, 1951; LARDY und PHILLIPS, 1943; LARDY et al., 1945). Das Sperma des Ziegenbocks zeigte sich gegen azide Einflüsse empfindlicher als gegen alkalische (FUKUHARA und NISHIKAWA, 1972). In den Untersuchungen von BLACKSHAW (1953) sank die Motilität von Bullen- und Schafbockspermien mit zunehmendem pH-Wert.

Die Spermien des Hengstes wiesen die beste Beweglichkeit bei einem pH-Wert von 6,8 auf. Sowohl ein pH-Wert von 5,5 als auch von 8,0 zeigten eine schädigende Wirkung (NYTKO, 1982).

Das pH-Optimum für Eberspermien lag bei pH 7,0 (TSO et al., 1980).

Die Geschwindigkeit von Bullenspermien stieg mit zunehmendem pH-Wert im Bereich von pH 5,7 - 7,5 an und fiel bei pH > 7,5 schnell ab (VAN DUIJN und RIKMENSPOEL, 1960).

Nach einer mehrstündigen Lagerung zeigten Proben mit einem alkalischen pH-Wert eine schlechtere Motilität als Proben mit einem neutralen oder sauren pH-Wert (NORMAN und JOHNSON, 1958; RICKARD et al., 1957). So fiel, bei mit Natriumzitrat-Puffer verdünntem Ziegenbocksperma, die Motilität nach einer 12-tägigen Lagerung bei einer Konzentration von 2,9% Natriumzitrat auf 62,6%, bei 3,5% auf 46,7% und bei 4,0% auf 24,3% (KOH and ONG, 1976). Bei der Messung der Massenbewegung von 1:1 verdünntem Sperma des Schafbockes traten in einem pH-Bereich von 5,0 bis 7,8 15 Minuten nach der Verdünnung keine Unterschiede in der Beweglichkeit auf. Je höher der pH-Wert der Probe war, desto früher sistierte deren Beweglichkeit (BARTOOV et al., 1980).

3. Material und Methode

3.1. Gewinnung der Ejakulate

Untersucht wurde das Sperma von 3 Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh im Alter von 2 - 4 Jahren, 4 Bergschafböcken (2 - 4 J.), 2 Ziegenböcken der Rasse Bunte Deutsche Edelziege (3 und 4 J.), 2 Warmbluthengsten (12 und 14 J.), 1 Haflingerhengst (7 J.), 1 Eber der Deutschen Landrasse (1 J.) und 1 Pietrain-Eber (3 J.). Alle Tiere waren klinisch gesund. Geschlechtsorgane und deren Funktion wiesen keine Besonderheiten auf.

Die Spermagewinnung wurde bei allen Tierarten mit der künstlichen Scheide durchgeführt.

3.2. Untersuchung der Ejakulate

Die Ejakulate von Hengst und Eber wurden unmittelbar nach der Gewinnung durch Filtrieren mit handelsüblichem Teefilterpapier von Schleim- und Gelbeimengungen gereinigt. Dann erfolgte eine Schätzung der Motilität des unverdünnten Spermas bei +38°C im Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung sowie eine Dichtebestimmung in der Zählkammer nach Bürker-Türk. Während dieser Zeit blieben die Ejakulate in einem Wasserbad von +21°C.

3.3. Verdünnung der Ejakulate

Im Anschluß an diese Untersuchungen wurde das Sperma mit einem tierartspezifischen Verdünner, der ebenfalls auf +21°C temperiert war, auf 50000 - 70000 Spermien/mm³ verdünnt. Die Zugabe des Verdünners erfolgte tropfenweise unter ständigem Schwenken des Gefäßes.

Im einzelnen wurden folgende Verdünner verwendet:

- Bulle: CUE-Tris-Verdünner zur Flüssigkonservierung
(PAUFLER, 1974)
Triladyl-Verdünner zur Tiefgefrierkonservierung
(Stethaimer Apotheke, Landshut)
- Schafbock: Natriumzitrat-Verdünner zur Flüssigkonservierung
(SCHLEICHER und BRÜCKNER, 1973)
Triladyl-Verdünner zur Tiefgefrierkonservierung
- Ziegenbock: Natriumzitrat-Verdünner zur Flüssigkonservierung
(ROSENWINKEL, 1953)
Triladyl-Verdünner zur Tiefgefrierkonservierung
- Hengst: Verdünner zur Flüssig- und Tiefgefrierkonservierung
nach MARTIN et al. (1979)
- Eber: "Kiew I-Verdünner" zur Flüssigkonservierung
(HAEGER und MÄCKLE, 1971).

Die Verdünner für Hengstsperma wurden 10 Min. bei 5000 U/Min. zentrifugiert, um die groben Eidotterpartikel zu entfernen und ein optisch klares Medium zu schaffen (RIKMENSPOEL, 1957).

3.4. Computergesteuerte Videomikrographie

3.4.1. Geräte

- Zählkammer nach Makler (Fa. Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel)
- Mikroskop, Typ "Optiphot" mit dem Objektiv Plan 20 DL (Fa. Nikon) und Heiztisch, Typ HT 100 (Fa. Minitüb, Landshut) bzw. Mikroskop, Typ "Standard WL" mit "Optovar" und dem Objektiv "Neofluar 16" und einem "Heiz- und Kühltisch 80" (Fa. Leitz)
- Schwarz-Weiß-Kamera, Typ RCA 2000 (Fa. RCA), auf das Mikroskop montiert
- Videorekorder, Typ AG 6200 (Fa. Panasonic)
- VHS-Videokassetten mit einer Spielzeit von 180 Minuten
- Schwarz-Weiß-Monitor, Typ TC 1910 X (Fa. RCA)
- Beschriftungsgerät "VTW 100" (Fa. FOR.A Co LTD, Tokyo)
- Mikroprocessor-Bild-Analyse-Computer "µBAC 8810" (Version 1986; Fa. Brunner, München)
- Personal-Computer, Typ PC AT (Fa. IBM)
- Drucker, Typ FX-85 (Fa. Epson)

3.4.2. Aufnahme der Proben auf Videoband

Von dem verdünnten Sperma wurde mit einer Pasteur-Pipette ein Tropfen in die auf +38°C vorgewärmte Makler-Kammer (MAKLER, 1980a) verbracht. Dieses Präparat wurde mikroskopisch auf seine Verwendbarkeit überprüft und anschließend 3 Gesichtsfelder je 10 Sek. auf Videoband aufgenommen. Pro Ejakulat wurden von 5 Präparaten je 3 Gesichtsfelder, insgesamt also 15 Gesichtsfelder, aufgezeichnet.

Die Aufnahmen erfolgten mit 200facher Vergrößerung im Phasenkontrast bei einer Heiztischtemperatur von +38°C. Hengstspermien wurden wegen der geringen Kopfgröße zur besseren Abbildung im Hellfeld aufgenommen.

3.4.3. Meßprinzip des Bildanalyse-Computers

Die Auswertung der auf Videoband aufgezeichneten Spermaprobe erfolgte durch den Mikroprozessor-Bild-Analyse-Computer μ BAC 8810 (Fa. Brunner). Der Mikroprozessor wandelt das Videobild in ein Digitalbild um, das aus 512 Zeilen $\times$ 512 Bildpunkten (= Pixels) besteht. Je nach Speicherkapazität des Mikroprozessors (1 mbyte oder 2 mbyte) kann entweder jede Bildschirmzeile mit allen Bildpunkten (Ganzbildverfahren), jede 2. Zeile mit jedem Punkt (Halbbildverfahren) oder jede 2. Zeile mit jedem 2. Punkt (Viertelbildverfahren) abgetastet werden. Es können wahlweise 8 oder 16

Bilder ausgewertet werden (Bildeinzug im Abstand von 20 oder 40 mSek.). Die Schwerpunktskoordinaten der identifizierten Spermienköpfe in jedem Bild werden gespeichert und von Bild zu Bild einander zugeordnet. In der Auswertung über 8 Bilder sind nur Spermien enthalten, die über mindestens 4 Bilder verfolgt werden konnten. Der Auswertungsmodus kann variiert werden zwischen einer dunklen Kontursuche gegen einen hellen Hintergrund und einer hellen Kontursuche gegen dunklen Hintergrund. Die Spermienköpfe der untersuchten Tiere bilden sich auf dem Schwarzweiß-Bild schwarz gegenüber ihrer grauen Umgebung ab. Durch den Untersucher kann vor der Auswertung eine Schwelle des Grauwertes eingestellt werden. Alle Punkte, die dunkler als dieser sogenannte Grauwert-Level erscheinen, werden vom Mikroprozessor als Spermium identifiziert. Um Verwechslungen mit anderen Partikeln, wie Schmutz oder Verdünnerbestandteilen, auszuschließen, sind die minimale und die maximale Spermienkopfgröße (Pixel) der auszuwertenden Spezies einzugeben. Die in diesen Untersuchungen gewählten Parameter für die einzelnen Tierarten sind in Tab. 1 dargestellt.

Die Einteilung in unbewegliche, ortsbewegliche und vorwärtsbewegliche Spermien erfolgt nach deren Geschwindigkeit. Zellen mit einer Vorwärtsbewegung von 0 - 10 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ gelten als unbeweglich, zwischen 10 und 30 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ als ortsbeweglich und über 30 $\mu\text{m}/\text{Sek.}$ als vorwärtsbeweglich.

Die vorwärtsbeweglichen Spermien werden der Form ihrer Bewegung entsprechend aufgegliedert in geradlinig, nicht geradlinig und

unphysiologisch Vorwärtsbewegliche. Dieser Einteilung liegt die zurückgelegte Wegstrecke zwischen Bild 1 und Bild 8 zugrunde. Der Wert einer fiktiven Strecke (S) zwischen Anfangs- und Endpunkt wird dividiert durch den Wert des tatsächlich zurückgelegten Weges (V). Ein Koeffizient von $> 0,8$ entspricht einer geradlinigen Vorwärtsbewegung, Koeffizienten zwischen 0,6 und 0,8 einer nicht geradlinigen Vorwärtsbewegung. Werte von $< 0,6$ weisen auf eine unphysiologische Vorwärtsbewegung hin.

Tab.1: Parameter für die Computerauswertung bei den untersuchten Tierarten

Parameter	Bulle	kl.Wdk.	Hengst	Eber
Min. Kopfgröße (Pixel)	10	10	6	10
Max. Kopfgröße (Pixel)	35	35	25	40
Grauwertschwelle (%)	70-85	70-85	70-85	70-85
Mindestkopfabstand (Pixel)	10	15	10	10
Grenze f. Unbew. ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	10	10	10	10
Grenze f. Vorw.b. ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	30	30	30	30
Zeit zw. 2 Bildern (msec)	40	40	40	40
Ausgewertete Bilder	8	8	8	8
Viertelbildverfahren	ja	ja	ja	ja

1 Pixel entspricht bei 200facher Vergrößerung $0,78 \mu\text{m} \times 1,04 \mu\text{m}$

3.5. Anwendbarkeit des Verfahrens bei verschiedenen Tierarten

Untersucht wurden je 5 Ejakulate von Bulle, Schafbock, Ziegenbock, Hengst und Eber. Nach der Spermagewinnung wurde das Sperma mit einem tierartspezifischen Verdünner zur Flüssigkonservierung verdünnt.

3.6. Überprüfung der Meßgenauigkeit

Die Meßgenauigkeit des Computers wurde durch Auswertung von Spermaproben mit einem definierten Anteil toter Spermien überprüft. Im split-sample-Verfahren wurden je 3 verdünnten Ejakulaten von Bulle, Schafbock, Ziegenbock, Hengst und Eber 20 ml entnommen, 2 Minuten lang in flüssigen Stickstoff getaucht und im Wasserbad bei +50°C wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde zweimal durchgeführt. Die anschließende mikroskopische Beurteilung zeigte, daß alle Samenzellen unbeweglich waren. Die inaktivierte Probe wurde mit dem unbehandelten Teil des verdünnten Ejakulates in folgenden Verhältnissen gemischt:

- Probe 0: 10,0 ml unbehandeltes Sperma
- Probe 50: 5,0 ml unbehandeltes + 5,0 ml inaktiviertes Sperma
- Probe 75: 2,5 ml unbehandeltes + 7,5 ml inaktiviertes Sperma

3.7. Einfluß der Temperatur

Die Aufnahmen erfolgten mit einem Mikroskop, Typ "Standard WL" (Fa. Zeiss) mit aufgesetztem Heiz- und Kühltisch (Fa. Leitz). Mit einer Wasser-Durchflußkühlung konnten auf dem Objektträgertisch auch Temperaturen unterhalb der Raumtemperatur erreicht werden.

Untersucht wurden je 5 Ejakulate von Bulle, Schafbock, Ziegenbock, Hengst und Eber. Nach der Verdünnung für eine Tiefgefrierkonservierung, beim Eber für die Flüssigkonservierung, wurden die Ejakulate bei einer Heiztischtemperatur von $+20^{\circ}\text{C}$, $+29^{\circ}\text{C}$ und $+38^{\circ}\text{C}$ aufgenommen. Während der Aufnahmen blieb das verdünnte Sperma in einem Wasserbad von $+20^{\circ}\text{C}$ stehen.

Von den verdünnten Ejakulaten wurden je 10 ml in Erlenmeyer-Kolben pipettiert. Diese wurden in einem Wasserbad (300 ml Volumen) bei $+20^{\circ}\text{C}$ in einen auf $+10^{\circ}\text{C}$ temperierten Kühltisch (Typ "Med 336", Fa. Kirsch) gestellt (Abb. 1). Nach 90 Minuten wurde das auf $+10^{\circ}\text{C}$ abgekühlte Sperma entnommen. Durch Zugabe von Eiswürfeln hatte das Wasserbad, auch nach Entnahme aus dem Kühltisch, eine konstante Temperatur von $+10^{\circ}\text{C}$. Die abgekühlte Probe wurde auf dem auf $+10^{\circ}\text{C}$ und $+15^{\circ}\text{C}$ eingestellten Kühltisch aufgenommen. Bei allen 5 Temperaturstufen blieb die Makler-Kammer auf dem temperierten Objektträgertisch stehen. Bei jeder neuen Füllung wurde vor der Aufnahme 1 Minute gewartet, um eine Adaptation der Spermien an die jeweilige Temperatur zu gewährleisten.

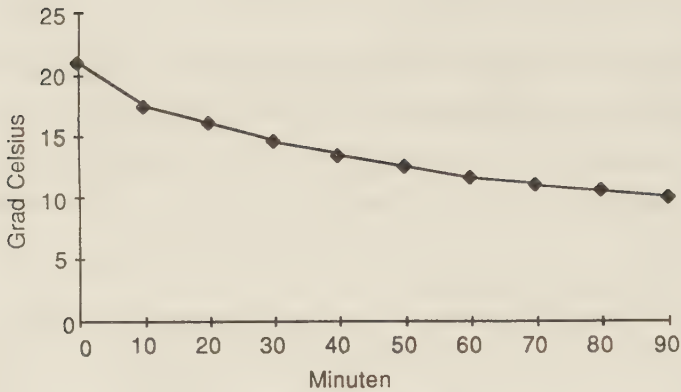


Abb. 1: Temperaturverlauf in Spermaproben bei Abkühlung im Wasserbad in einem Kühlschrank von +10 Grad Celsius

3.8. Einfluß des Tiefgefrierens

Die für die Tiefgefrierkonservierung verdünnten Ejakulate der Wiederkäuer wurden in Pailletten von 0,5 ml Volumen (Adaptionszeit 2 Std. bei +5°C), die des Hengstes in Makropailletten von 4,0 ml Volumen (keine Adaptionszeit) abgefüllt. Die Pailletten wurden für 15 Minuten in Stickstoffdampf tiefgefroren und in flüssigem Stickstoff bei -196°C eine Woche gelagert. Zur Untersuchung wurde pro Ejakulat eine Paillette aufgetaut: Samenproben vom Wiederkäuer 15 Sek. bei +38°C, Makropailletten (Hengst) 45 Sekunden bei +50°C.

3.9. Einfluß des pH-Wertes und der Flüssigkonservierung

Zur Untersuchung kamen je 5 Ejakulate von Bulle, Schafbock, Ziegenbock, Hengst und Eber. Im split-sample-Verfahren wurden von jedem Ejakulat 3 Verdünnungen mit unterschiedlichen pH-Werten hergestellt. Dazu wurden tierartspezifische Verdünner zur Flüssigkonservierung verwendet:

- mit ursprünglichem pH-Wert
- mit um pH 1,0 erniedrigtem pH-Wert durch Zugabe von 5,5%iger Zitronensäure (pH 1,8)
- mit um pH 1,0 erhöhtem pH-Wert durch Zugabe von 0,4 n Natronlauge (pH 13,5).

Die Osmolalität wurde durch die Änderung des pH-Wertes nicht beeinflusst. Aus der Zugabe von Säure bzw. Base resultierten folgende pH-Werte:

Bulle:	CUE-Tris-Verdünner mit pH 5,8 - 6,8 - 7,8
Schafbock:	Natriumzitrat-Verdünner mit pH 6,3 - 7,3 - 8,3
Ziegenbock:	Natriumzitrat-Verdünner mit pH 6,1 - 7,1 - 8,1
Hengst:	Verdünner zur Flüssigkonservierung mit pH 5,7 - 6,7 - 7,7
Eber:	"Kiew I-Verdünner" mit pH 5,8 - 6,8 - 7,8

Jede Probe wurde sofort nach der Verdünnung (0 Std.) und nach einer Lagerungsdauer von 24 Stunden untersucht. Die Lagerungstemperatur betrug dabei für den Ebersamen +15°C, für den Samen der anderen Tierarten +5°C.

3.10. Statistische Methoden

In die statistischen Berechnungen gingen die Absolutzahlen der ausgewerteten Spermien in einem Präparat ein. Angewandt wurden aus dem Statistikprogrammsystem für die Sozialwissenschaften die Varianzanalyse und der t-Test (SCHUBÖ und UEHLINGER, 1986).

4. Ergebnisse

4.1. Anwendbarkeit des Systems bei verschiedenen Spezies

Die Auswertung verdünnter Spermaproben war bei Bulle, Schafbock, Ziegenbock, Hengst und Eber möglich. Im Durchschnitt erfaßte der Computer pro Spermaprobe 704 Samenzellen. Die Anzahl der Spermien in einer Bewegungsklasse wurde in Prozentanteile umgerechnet.

Daraus resultierten folgende Werte:

Der höchste Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien wurde beim Ziegenbock (75,1%) gemessen, der niedrigste beim Eber (33,5%). Der größte Anteil ortsbeweglicher Spermien war in den Ejakulaten des Schafbockes vorhanden (23,5%), auch beim Eber war er mit 19,8% sehr hoch. Das Sperma von Hengst und Eber enthielt die meisten unbeweglichen Samenzellen (Tab. 2; Abb. 2).

Tab. 2: Motilitätsparameter im Sperma einiger Tierarten nach Verdünnung ($\bar{x} \pm s$ aus je 5 Ejakulaten; pro Spezies 2 Individuen mit 2 bzw. 3 Ejakulaten)

Tierart	% Vorwärtsbewegliche	% Ortsbewegliche	% Unbewegliche
Bulle	72,6 $\pm$ 9,0	9,6 $\pm$ 3,2	17,8 $\pm$ 9,1
Schafbock	55,6 $\pm$ 15,0	21,5 $\pm$ 7,7	22,9 $\pm$ 6,3
Ziegenbock	75,1 $\pm$ 9,3	14,0 $\pm$ 5,7	10,9 $\pm$ 4,6
Hengst	50,2 $\pm$ 19,0	17,9 $\pm$ 9,7	31,8 $\pm$ 12,0
Eber	33,5 $\pm$ 8,7	19,8 $\pm$ 4,8	46,6 $\pm$ 11,4

Bei der Klassifizierung der vorwärtsbeweglichen Spermien in geradlinig vorwärtsbewegliche (Index $\geq 0,8$), nicht geradlinig vorwärtsbewegliche (Index 0,6-0,8) und unphysiologisch vorwärtsbewegliche (Index $< 0,6$) bewegten sich die Spermien des Bullen und des Schafbockes zu über 80% geradlinig fort. Die Spermien des Ziegenbockes wurden wegen ihrer charakteristischen Bewegungsform zum großen Teil vom Computer als nicht geradlinig eingestuft, da durch die schnellen Kopfbewegungen zur Seite der zurückgelegte Weg (V) sehr groß war und der Index S/V dadurch $< 0,8$ wurde. Die Samenzellen des Hengstes bewegten sich zu 71,0% geradlinig fort, die des Ebers waren nahezu gleichmäßig auf die drei Bewegungsklassen verteilt (Tab. 3).

Tab.3: Prozentuale Verteilung der vorwärtsbeweglichen Spermien in den einzelnen Bewegungsklassen ($\bar{x} \pm s$ aus je 5 Ejakulaten; pro Spezies 2 Individuen mit 2 bzw. 3 Ejakulaten)

Tierart	vorwärts beweglich %	Alle vorwärtsbeweglichen Spermien = 100%		
		geradlinig	nicht geradl.	unphysiolog.
Bulle	72,6	82,1 $\pm$ 9,7	14,1 $\pm$ 9,4	3,8 $\pm$ 2,0
Schafbock	55,6	85,3 $\pm$ 8,4	8,3 $\pm$ 5,6	6,0 $\pm$ 3,7
Ziegenbock	75,1	55,5 $\pm$ 12,9	32,1 $\pm$ 10,0	12,4 $\pm$ 5,5
Hengst	50,2	71,0 $\pm$ 8,3	21,7 $\pm$ 7,6	7,2 $\pm$ 2,2
Eber	33,5	32,8 $\pm$ 11,4	35,3 $\pm$ 9,3	30,9 $\pm$ 17,0

Eine Zusammenfassung der Tabellen 2 und 3 mit Angabe der relativen Anteile der Bewegungsklassen verdeutlicht die speziesbedingten quantitativen und qualitativen Unterschiede der Beweglichkeit (Abb. 2; die Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien sind schraffiert dargestellt).

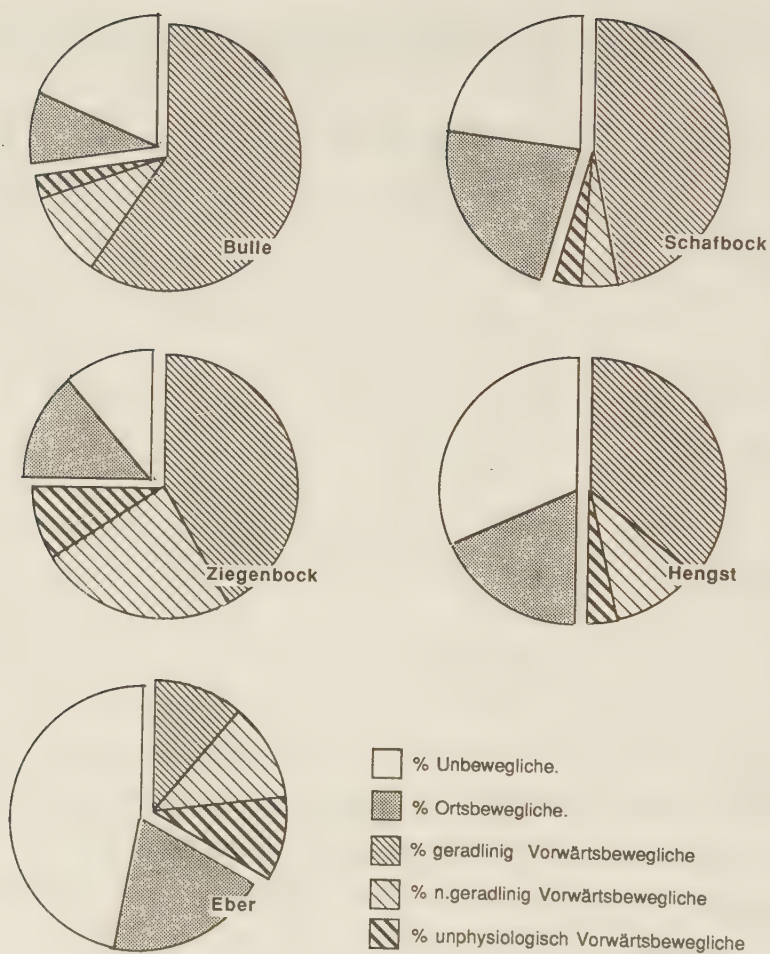


Abb. 2: Relative Verteilung (%) der erfaßten Samenzellen auf die Bewegungsklassen
(Alle erfaßten Spermien = 100%).

Beim Vergleich der durchschnittlichen Geschwindigkeiten aller vorwärtsbeweglichen Spermien (Tab. 4) bewegten sich die des Ziegenbockes am schnellsten und die des Ebers am langsamsten vorwärts. Die geradlinig vorwärtsbeweglichen Samenzellen schwammen bei allen untersuchten Tierarten, außer beim Ziegenbock, am schnellsten. Die Spermien des Ziegenbockes wurden durch ihre "Zick-Zack"-artige Bewegungsform den nicht geradlinigen zugeordnet. Die niedrigsten Geschwindigkeiten hatten bei allen Spezies die unphysiologisch vorwärtsbeweglichen Spermien. Die Geschwindigkeiten in den 3 Bewegungsklassen verhielten sich am einheitlichsten beim Eber, der Schafbock wies die größten Unterschiede auf.

Tab. 4: Durchschnittsgeschwindigkeiten ($\mu\text{m}/\text{sec}$) der Spermien in den einzelnen Bewegungsklassen bei einigen Haustierarten ($\bar{x} \pm s$ aus je 5 Ejakulaten; pro Spezies 2 Individuen mit 2 bzw. 3 Ejakulaten)

Tierart	Geschwindigkeiten ($\mu\text{m}/\text{sec}$)			
	gesamt	geradlinig	nicht geradlinig	unphysiologisch
Bulle	$67,4 \pm 13,8$	$69,9 \pm 13,6$	$57,4 \pm 14,0$	$41,5 \pm 14,8$
Schafbock	$113,6 \pm 11,3$	$122,5 \pm 9,7$	$68,1 \pm 17,1$	$55,0 \pm 11,7$
Ziegenbock	$117,1 \pm 11,7$	$118,6 \pm 13,3$	$124,2 \pm 14,2$	$87,8 \pm 17,2$
Hengst	$80,8 \pm 14,5$	$87,6 \pm 13,7$	$66,2 \pm 16,0$	$51,8 \pm 11,2$
Eber	$51,2 \pm 4,5$	$59,3 \pm 9,1$	$52,5 \pm 5,7$	$41,7 \pm 5,1$

4.2. Überprüfung der Meßgenauigkeit

Die Zugabe einer definierten Menge inaktivierten Spermas zu einer unbehandelten Samenprobe reduzierte den Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien. Der Anteil unbeweglicher Spermien erhöhte sich parallel zum Zusatz der inaktivierten Zellen. Die Unterschiede der unbeweglichen, orts- und vorwärtsbeweglichen Spermien zwischen den 3 Proben waren hochsignifikant ($p < 0,01$; Tab. 5).

Die Korrelationskoeffizienten zwischen den vom Computer gemessenen Werten für den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Zellen und den subjektiv geschätzten, bzw. danach errechneten, Werten betrugen für den Bullen $r = 0,99$, für den Schafbock $r = 0,99$, für den Ziegenbock $r = 0,99$, für den Hengst $r = 0,98$ und für den Eber $r = 0,94$.

Ein Zusatz von inaktivierten Samenzellen hatte nur beim Ziegenbock einen Einfluß auf die Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien. Bei dieser Tierart war nach Zusatz von inaktivierten Samenzellen ein signifikanter Unterschied dieses Parameters zwischen den 3 Proben vorhanden ($p < 0,05$; Tab. 6).

Setzt man den in der unbehandelten Probe gemessenen Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien = 100, so wird die gute Übereinstimmung der gemessenen zu den theoretisch zu erwartenden Werten deutlich (Tab. 7).

Tab. 5: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien nach Zusatz von 0%, 50% und 75% inaktiviertem Samen ($\bar{x} \pm s$ von je 3 Ejakulaten)

Tierart	Anteil inaktivierten Spermas		
	0 %	50 %	75 %
Bulle	77,8 $\pm$ 5,7	40,4 $\pm$ 7,2	20,3 $\pm$ 5,8
Schafbock	64,9 $\pm$ 9,8	29,9 $\pm$ 6,5	13,7 $\pm$ 4,0
Ziegenbock	73,7 $\pm$ 17,1	31,5 $\pm$ 10,3	16,0 $\pm$ 6,3
Hengst	45,2 $\pm$ 15,2	21,6 $\pm$ 8,6	9,0 $\pm$ 5,2
Eber	39,8 $\pm$ 12,1	16,4 $\pm$ 6,9	8,5 $\pm$ 3,2

Tab. 6: Durchschnittliche Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{sec}$) aller vorwärtsbeweglichen Spermien nach Zusatz von 0%, 50% und 75% inaktiviertem Sperma ($\bar{x} \pm s$ von je 3 Ejakulaten)

Tierart	Anteil inaktivierten Spermas		
	0 %	50 %	75 %
Bulle	66,6 $\pm$ 7,7	66,0 $\pm$ 5,2	62,6 $\pm$ 5,4
Schafbock	84,9 $\pm$ 12,0	79,9 $\pm$ 11,2	79,0 $\pm$ 9,1
Ziegenbock	86,8 $\pm$ 6,5	78,1 $\pm$ 12,0	80,5 $\pm$ 4,4
Hengst	77,6 $\pm$ 14,4	75,2 $\pm$ 14,6	71,0 $\pm$ 18,2
Eber	47,0 $\pm$ 3,8	49,2 $\pm$ 4,4	50,5 $\pm$ 6,0

Tab. 7: Relative Abweichung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien nach Zusatz von 50% und 75% inaktiviertem Samen (vorwärtsbewegliche Spermien = 100% bei der unbehandelten Probe)

Tierart	Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen		
	100 %	50 %	25 %
Bulle	100	51,9	26,1
Schafbock	100	46,1	21,1
Ziegenbock	100	42,7	21,7
Hengst	100	47,8	19,9
Eber	100	41,2	21,3

4.3. Einfluß der Temperatur

4.3.1. Bulle

Der durchschnittlich ermittelte Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien lag bei einer Temperatur von $+38^{\circ}\text{C}$ bei 69,8 (Tab. 8). Bei $+29^{\circ}\text{C}$ betrug er, in etwa unverändert, 71,8% und sank dann bei $+20^{\circ}\text{C}$ auf 56,7% ($p < 0,05$). Bei $+15^{\circ}\text{C}$ bewegten sich in einer Spermaprobe des Bullen durchschnittlich noch 8,9% aller erfaßten Zellen vorwärts, bei $+10^{\circ}\text{C}$ nur 0,2%. Der Anteil ortsbeweglicher Spermien änderte sich nur leicht. Der Prozentsatz unbeweglicher Zellen verhielt sich umgekehrt proportional zu den vorwärtsbeweglichen Spermien. Die Geschwindigkeit aller vorwärtsbeweglichen Zellen nahm mit sinkender Temperatur nahezu linear ab (Tab. 8).

Eine Bewegungsklassifikation der vorwärtsbeweglichen Spermien erschien bei einer Temperatur von $+10^{\circ}\text{C}$ nicht sinnvoll, da der ermittelte Prozentsatz zu gering war. Von $+38^{\circ}\text{C}$ bis $+15^{\circ}\text{C}$ nahm der Anteil geradlinig vorwärtsbeweglicher Spermien ab. Am deutlichsten war diese Änderung der Bewegungsform zwischen $+29^{\circ}\text{C}$ und $+20^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,05$). Der Prozentsatz nicht geradlinig und unphysiologisch vorwärtsbeweglicher Spermien erhöhte sich parallel dazu. Den höchsten Wert erreichten die geradlinigen bei $+38^{\circ}\text{C}$, die nicht geradlinigen bei $+20^{\circ}\text{C}$ und die unphysiologischen bei $+15^{\circ}\text{C}$ (Tab. 9). Die Streuungen der Meßwerte für den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien und ihre Bewegungsklassen wurde mit sinkender Temperatur größer.

Tab. 8: Einfluß der Temperatur auf die Motilität von Bullenspermien ($\bar{x} \pm s$ aus 5 Ejakulaten; 2 von Bulle 1 und 3 Ejakulate von Bulle 2)

Temperatur	Prozentualer Anteil			$\mu\text{m/sec}$
	unbeweglich	ortsbew.	vorwärtsbew.	vorwärtsbew.
+10°C	93,0 $\pm$ 3,6	6,8 $\pm$ 3,8	0,2 $\pm$ 0,5	10,5 $\pm$ 22,7
+15°C	72,4 $\pm$ 13,4	18,7 $\pm$ 7,7	8,9 $\pm$ 7,2	34,6 $\pm$ 10,0
+20°C	25,8 $\pm$ 12,2	17,4 $\pm$ 5,0	56,7 $\pm$ 12,3	47,1 $\pm$ 7,0
+29°C	16,5 $\pm$ 8,8	11,7 $\pm$ 4,9	71,8 $\pm$ 11,3	67,2 $\pm$ 6,4
+38°C	16,1 $\pm$ 9,3	14,1 $\pm$ 4,0	69,8 $\pm$ 11,7	77,5 $\pm$ 5,9

Tab. 9: Einfluß der Temperatur auf den prozentualen Anteil der Bewegungsformen vorwärtsbeweglicher Spermien vom Bullen ($\bar{x} \pm s$ aus 5 Ejakulaten; 2 von Bulle 1 und 3 Ejakulate von Bulle 2)

Temperatur	vorwärtsbeweglich %	Alle vorwärtsbeweglichen Spermien = 100%		
		geradlinig	nicht geradl.	unphysiolog.
+10°C	0,2 [*]	-	-	-
+15°C	8,9	9,4 $\pm$ 13,6	49,6 $\pm$ 32,0	41,0 $\pm$ 32,3
+20°C	56,7	31,6 $\pm$ 12,9	53,9 $\pm$ 7,9	14,5 $\pm$ 9,2
+29°C	71,8	72,5 $\pm$ 9,4	23,6 $\pm$ 7,7	3,9 $\pm$ 3,0
+38°C	69,8	92,2 $\pm$ 3,7	5,9 $\pm$ 3,2	1,9 $\pm$ 1,9

*

Aufschlüsselung in Bewegungsformen wegen zu geringem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien nicht sinnvoll

4.3.2. Schafbock

Der Anteil unbeweglicher Spermien betrug 18,1% bei einer Temperatur von +38°C (Tab. 10). Mit sinkender Temperatur erhöhte er sich, bis er bei +10°C sein Maximum von 83,3% erreichte. Der Prozentsatz ortsbeweglicher Spermien änderte sich nur wenig, den höchsten Wert (26,7%) erreichte er bei +15°C. Die meisten vorwärtsbeweglichen Spermien wurden bei einer Temperatur von +38°C gemessen. Der Motilitätsabfall mit sinkender Temperatur war besonders stark ausgeprägt zwischen +29°C und +20°C ($p < 0,005$). Auffallend ist der hohe Anteil vorwärts- und ortsbeweglicher Zellen bei +15°C, hier sind durchschnittlich 50,2% aller Spermien beweglich. Bei +10°C sistierte die Beweglichkeit. Die Geschwindigkeit aller vorwärtsbeweglichen Spermien verringerte sich linear mit der Temperatursenkung von 94,8 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei +38°C auf 17,8 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei +10°C (Differenz $p < 0,001$; Tab. 10).

Die Bewegungsformen der vorwärtsbeweglichen Samenzellen änderten sich bei den verschiedenen Temperaturstufen ähnlich wie beim Bullen. Der Anteil geradliniger Spermien nahm mit sinkender Temperatur ab, bei +20°C zeigten nur noch 17,7% der vorwärtsbeweglichen Spermien eine geradlinige Bewegung, während 50,6% nicht geradlinig schwammen. Bei +15°C bewegten sich die motilen Spermien zu 52,8% unphysiologisch vorwärts. Diese Verschiebung von einer überwiegend geradlinigen Bewegung bei hohen Temperaturen zu einer unphysiologischen Fortbewegung bei niedrigen Temperaturen war am deutlichsten zwischen +29°C und +20°C ($p < 0,05$; Tab. 11).

Tab. 10: Einfluß der Temperatur auf die Motilität von Schafbock-spermien ($\bar{x} \pm s$ aus 5 Ejakulaten; 2 von Schafbock 1 und 3 Ejakulate von Schafbock 2)

Temperatur	Prozentualer Anteil			$\mu\text{m/sec}$
	unbeweglich	ortsbew.	vorwärtsbew.	vorwärtsbew.
+10°C	83,3 $\pm$ 6,3	16,2 $\pm$ 6,1	0,5 $\pm$ 0,7	17,8 $\pm$ 22,7
+15°C	49,8 $\pm$ 14,6	26,7 $\pm$ 7,6	23,5 $\pm$ 14,7	35,0 $\pm$ 4,2
+20°C	20,6 $\pm$ 9,0	19,7 $\pm$ 6,3	59,7 $\pm$ 14,0	53,4 $\pm$ 7,1
+29°C	14,5 $\pm$ 5,7	16,9 $\pm$ 5,4	68,5 $\pm$ 9,8	79,6 $\pm$ 13,1
+38°C	18,1 $\pm$ 5,7	12,8 $\pm$ 5,4	69,1 $\pm$ 8,5	94,8 $\pm$ 12,4

Tab. 11: Einfluß der Temperatur auf den prozentualen Anteil der Bewegungsformen vorwärtsbeweglicher Spermien vom Schafbock ($\bar{x} \pm s$ aus 5 Ejakulaten, 2 von Schafbock 1 und 3 Ejakulate von Schafbock 2)

Temperatur	vorwärts- beweglich %	Alle vorwärtsbeweglichen Spermien = 100%		
		geradlinig	nicht geradl.	unphysiolog.
+10°C	0,5 [*]	-	-	-
+15°C	23,5	8,5 $\pm$ 7,2	37,8 $\pm$ 12,5	52,8 $\pm$ 16,5
+20°C	59,7	17,7 $\pm$ 5,8	50,6 $\pm$ 7,4	31,6 $\pm$ 6,9
+29°C	68,5	82,6 $\pm$ 9,6	13,5 $\pm$ 7,3	3,9 $\pm$ 2,9
+38°C	69,1	91,7 $\pm$ 3,5	5,6 $\pm$ 2,7	2,7 $\pm$ 1,7

*

Aufschlüsselung in Bewegungsformen wegen zu geringem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien nicht sinnvoll

4.3.3. Ziegenbock

Beim Ziegenbock ergab sich für den Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen zwischen +29°C und +38°C kaum ein Unterschied (Tab. 12). Bei +15°C bewegten sich 26,8% aller Zellen vorwärts und bei +10°C nur noch 0,5%. Der Anteil ortsbeweglicher Spermien blieb bei der Temperaturänderung nahezu konstant, auffallend war der hohe Wert von 25,7% bei +15°C. Der Prozentsatz unbeweglicher Zellen blieb bei +38°C und +29°C fast gleich, stieg dann aber unterhalb +29°C signifikant an ($p < 0,05$).

Die durchschnittliche Geschwindigkeit aller vorwärtsbeweglichen Spermien sank linear mit abnehmender Temperatur von 98,7 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei +38°C auf 10,6 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei +10°C ($p < 0,05$; Tab. 12).

Wie bei Bulle und Schafbock änderte sich auch beim Ziegenbock die Bewegungsklassifikation der vorwärtsbeweglichen Spermien. Mit sinkender Temperatur nahm der Anteil der geradlinig vorwärtsbeweglichen ab, während der der unphysiologisch vorwärtsbeweglichen zunahm. Bei einer Temperatur von +29°C bewegten sich die Spermien zu 89,0% geradlinig vorwärts, bei +20°C fiel ihr Anteil auf 26,3% und bei +15°C auf 5,2%. Parallel dazu erhöhte sich der Anteil der unphysiologisch Vorwärtsbeweglichen von 3,1% bei +38°C auf 70,9% bei +15°C (Tab. 13). Da bei +10°C nur 0,5% der Spermien vorwärtsbeweglich waren, können diese Werte nicht in die Betrachtungen einbezogen werden.

Tab. 12: Einfluß der Temperatur auf die Motilität von Ziegenbock-spermien ($\bar{x} \pm s$ aus 5 Ejakulaten; 2 von Ziegenbock 1 und 3 Ejakulate von Ziegenbock 2)

Temperatur	Prozentualer Anteil			$\mu\text{m/sec}$
	unbeweglich	ortsbew.	vorwärtsbew.	vorwärtsbew.
+10°C	84,6 $\pm$ 4,4	14,9 $\pm$ 4,1	0,5 $\pm$ 0,8	10,6 $\pm$ 16,4
+15°C	47,5 $\pm$ 6,7	25,7 $\pm$ 5,1	26,8 $\pm$ 6,7	36,6 $\pm$ 3,0
+20°C	23,2 $\pm$ 9,6	13,7 $\pm$ 5,6	63,1 $\pm$ 13,5	54,8 $\pm$ 4,5
+29°C	11,1 $\pm$ 4,9	12,9 $\pm$ 4,6	76,0 $\pm$ 7,8	81,6 $\pm$ 7,6
+38°C	11,5 $\pm$ 5,8	14,5 $\pm$ 4,3	74,1 $\pm$ 9,0	98,7 $\pm$ 7,0

Tab. 13: Einfluß der Temperatur auf den prozentualen Anteil der Bewegungsformen der vorwärtsbeweglichen Spermien vom Ziegenbock ($\bar{x} \pm s$ aus 5 Ejakulaten; 2 von Ziegenbock 1 und 3 Ejakulate von Ziegenbock 2)

Temperatur	vorwärts- beweglich %	Alle vorwärtsbeweglichen Spermien = 100%		
		geradlinig	nicht geradl.	unphysiolog.
+10°C	[*] 0,5	-	-	-
+15°C	26,8	5,2 $\pm$ 4,8	23,9 $\pm$ 8,8	70,9 $\pm$ 9,4
+20°C	63,1	26,3 $\pm$ 11,5	50,2 $\pm$ 5,7	23,5 $\pm$ 11,2
+29°C	76,0	89,0 $\pm$ 3,4	8,4 $\pm$ 5,1	2,6 $\pm$ 2,2
+38°C	74,1	93,5 $\pm$ 3,6	3,4 $\pm$ 2,4	3,1 $\pm$ 2,3

*

Aufschlüsselung in Bewegungsformen wegen zu geringem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien nicht sinnvoll

4.3.4. Hengst

Die Spermien des Hengstes wiesen sowohl bei dem Parameter Vorwärtsbeweglichkeit als auch bei der Temperatur die größte Resistenz gegen Temperatureinflüsse auf (Tab. 14). Bei einer Temperatur von $+38^{\circ}\text{C}$ waren durchschnittlich 30,4% aller Samenzellen eines Ejakulates vorwärtsbeweglich. Ihr Anteil sank bis $+29^{\circ}\text{C}$ auf 20,7% ab ($p < 0,05$) und blieb bei den niedrigeren Temperaturstufen in etwa unverändert. Der Anteil ortsbeweglicher Spermien blieb über alle untersuchten Temperaturstufen hinweg nahezu konstant bei ca. 25% ($p = 0,23$). Auch beim Prozentsatz unbeweglicher Zellen war ein deutlicher Anstieg nur zwischen $+29^{\circ}\text{C}$ und $+38^{\circ}\text{C}$ vorhanden ($p < 0,05$).

Die Geschwindigkeit aller vorwärtsbeweglichen Spermien sank kontinuierlich von 58,6 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei $+38^{\circ}\text{C}$ auf 42,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei $+10^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,001$; Tab. 14).

Im Temperaturbereich von $+38^{\circ}\text{C}$ bis $+15^{\circ}\text{C}$ sank der Anteil geradlinig vorwärtsbeweglicher Zellen mit fallender Temperatur, parallel dazu stieg der Anteil der unphysiologisch beweglichen Spermien. Bei $+10^{\circ}\text{C}$ kehrte sich dieses Verhältnis um. Hier bewegten sich 51,5% aller vorwärtsbeweglichen Spermien geradlinig (Tab. 15). Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß bei 20,2% vorwärtsbeweglichen Spermien der Unterschied nur ca. 5% der ausgewerteten Spermien beträgt. Die hohe Standardabweichung weist darauf hin, daß dieser Unterschied nicht von Bedeutung ist (Tab. 15).

Tab. 14: Einfluß der Temperatur auf die Motilität von Hengst-spermien ($\bar{x} \pm s$ aus 5 Ejakulaten; 2 von Hengst 1 und 3 Ejakulate von Hengst 2)

Temperatur	Prozentualer Anteil			$\mu\text{m/sec}$
	unbeweglich	ortsbew.	vorwärtsbew.	vorwärtsbew.
+10°C	56,1 $\pm$ 16,0	26,1 $\pm$ 6,5	20,2 $\pm$ 14,2	42,5 $\pm$ 6,4
+15°C	54,2 $\pm$ 15,2	25,0 $\pm$ 6,8	20,8 $\pm$ 10,6	47,0 $\pm$ 6,3
+20°C	55,2 $\pm$ 18,3	22,7 $\pm$ 8,2	22,1 $\pm$ 14,7	46,4 $\pm$ 6,2
+29°C	54,7 $\pm$ 16,6	24,6 $\pm$ 8,1	20,7 $\pm$ 10,4	50,3 $\pm$ 5,0
+38°C	40,0 $\pm$ 10,6	29,5 $\pm$ 7,1	30,4 $\pm$ 9,2	58,6 $\pm$ 9,3

Tab. 15: Einfluß der Temperatur auf den prozentualen Anteil der Bewegungsformen vorwärtsbeweglicher Spermien vom Hengst ($\bar{x} \pm s$ aus 5 Ejakulaten; 2 von Hengst 1 und 3 Ejakulate von Hengst 2)

Temperatur	vorwärts- beweglich %	Alle vorwärtsbeweglichen Spermien = 100%		
		geradlinig	nicht geradl.	unphysiolog.
+10°C	20,2	51,5 $\pm$ 18,7	32,3 $\pm$ 9,3	17,3 $\pm$ 12,8
+15°C	20,8	26,6 $\pm$ 19,7	29,9 $\pm$ 8,7	43,5 $\pm$ 23,2
+20°C	22,1	22,7 $\pm$ 14,9	32,1 $\pm$ 11,3	45,2 $\pm$ 16,1
+29°C	20,7	33,7 $\pm$ 15,0	28,0 $\pm$ 8,2	38,2 $\pm$ 16,1
+38°C	30,4	47,8 $\pm$ 20,2	24,2 $\pm$ 6,1	28,0 $\pm$ 19,2

4.3.5. Eber

Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nahm im Bereich von $+38^{\circ}\text{C}$ bis $+15^{\circ}\text{C}$ mit sinkender Temperatur ab ($p < 0,05$; Tab. 16).

Bewegungslosigkeit trat bei $+15^{\circ}\text{C}$ ein. Hier schwammen nur noch 1,2% aller Spermien vorwärts und 8,5% zeigten "Ortsbewegung". Parallel dazu stieg der Prozentsatz der unbeweglichen Zellen von 34,1% bei $+38^{\circ}\text{C}$ auf 90,3% bei $+15^{\circ}\text{C}$, wobei der deutlichste Anstieg bei einer Temperatursenkung von $+20^{\circ}\text{C}$ auf $+15^{\circ}\text{C}$ stattfand. Die Werte bei $+15^{\circ}\text{C}$ und $+10^{\circ}\text{C}$ können weder für den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Samenzellen noch für die Geschwindigkeit als repräsentativ gelten, da sich bei diesen Temperaturstufen nur 1,5% bzw. 1,2% aller erfaßten Spermien vorwärts bewegten.

Die Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Zellen sank kontinuierlich von 58,6 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei $+38^{\circ}\text{C}$ auf 40,4 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei $+20^{\circ}\text{C}$ (Tab. 16).

Der Anteil der geradlinig vorwärtsbeweglichen Zellen nahm zwischen $+38^{\circ}\text{C}$ und $+29^{\circ}\text{C}$ von 42,1% auf 30,5% ab, während der Anteil der nicht geradlinigen und unphysiologischen jeweils leicht anstieg. Bei einer Temperatursenkung von $+29^{\circ}\text{C}$ auf $+20^{\circ}\text{C}$ kam es zu einer sehr deutlichen Verschiebung in den Bewegungsklassen. Der Anteil der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien lag bei $+20^{\circ}\text{C}$ nur noch bei 16,9% ($p < 0,05$; Tab. 17).

Tab. 16: Einfluß der Temperatur auf die Motilität von Eberspermien ($\bar{x} \pm s$ aus 5 Ejakulaten; 2 von Eber 1 und 3 Ejakulate von Eber 2)

Temperatur	Prozentualer Anteil			$\mu\text{m/sec}$
	unbeweglich	ortsbew.	vorwärtsbew.	vorwärtsbew.
+10°C	85,8 $\pm$ 5,6	12,7 $\pm$ 5,3	1,5 $\pm$ 1,2	31,9 $\pm$ 17,0
+15°C	90,3 $\pm$ 4,7	8,5 $\pm$ 3,7	1,2 $\pm$ 1,3	25,2 $\pm$ 20,9
+20°C	42,6 $\pm$ 12,4	31,0 $\pm$ 5,3	26,4 $\pm$ 10,6	40,4 $\pm$ 3,5
+29°C	39,6 $\pm$ 12,0	26,2 $\pm$ 5,9	34,2 $\pm$ 13,2	49,0 $\pm$ 5,0
+38°C	34,1 $\pm$ 11,1	22,2 $\pm$ 5,0	43,7 $\pm$ 12,2	58,6 $\pm$ 6,3

Tab. 17: Einfluß der Temperatur auf den prozentualen Anteil der Bewegungsformen vorwärtsbeweglichen Spermien vom Eber ($\bar{x} \pm s$ aus 5 Ejakulaten; 2 von Eber 1 und 3 Ejakulate von Eber 2)

Temperatur	vorwärtsbeweglich %	Alle vorwärtsbeweglichen Spermien = 100%		
		geradlinig	nicht geradl.	unphysiolog.
+10°C	[*] 1,5	-	-	-
+15°C	[*] 1,2	-	-	-
+20°C	26,4	16,9 $\pm$ 8,3	33,8 $\pm$ 7,4	49,3 $\pm$ 10,6
+29°C	34,2	30,5 $\pm$ 9,1	39,6 $\pm$ 8,6	30,0 $\pm$ 6,7
+38°C	43,7	42,1 $\pm$ 11,8	35,2 $\pm$ 7,6	22,6 $\pm$ 9,4

*

Aufschlüsselung in Bewegungsformen wegen zu geringem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien nicht sinnvoll

4.3.6. Tierartlicher Vergleich

Die Temperatur einer verdünnten Samenprobe beeinflusste den Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien und deren Fortbewegungsgeschwindigkeit in unterschiedlichem Maße. Dabei kam es auch zu speziesspezifischen Unterschieden (Abb. 3 und 4).

Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien der Wiederkäuer bei +10°C betrug nahezu Null. Nach einem bei Bulle, Schaf- und Ziegenbock sehr einheitlich verlaufendem Anstieg erreichte er sein Maximum bei +29°C oder +38°C, wobei die Unterschiede zwischen diesen beiden Temperaturstufen minimal waren. Die Spermien des Ebers waren bei +10°C und +15°C immotil, zwischen +20°C und +38°C stieg die Beweglichkeit konstant an. Die größten Unterschiede in den Werten für den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien lagen bei den Wiederkäuern und beim Eber zwischen +15°C und +20°C. Hengstspermien zeigten sich von allen untersuchten Tierarten am widerstandsfähigsten gegen niedrige Temperaturen; auch bei +10°C bewegten sich noch ca. 20% aller Spermien einer Probe, dieser Wert änderte sich nur geringfügig bis +29°C und stieg dann bei +38°C auf 30,4% an.

Mit zunehmender Temperatur erhöhte sich bei allen untersuchten Spezies die Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien. Am ausgeprägtesten war dies bei den Wiederkäuern zu beobachten, wo die durchschnittliche Geschwindigkeit kontinuierlich anstieg von ca. 10 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei +10°C auf ca. 70 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei +38°C. Auch beim Eber

stieg die Geschwindigkeit im Bereich von $+20^{\circ}\text{C}$ bis $+38^{\circ}\text{C}$ konstant an. Die Meßwerte bei $+10^{\circ}\text{C}$ und $+15^{\circ}\text{C}$ für Eberspermien sowie die bei $+10^{\circ}\text{C}$ für Spermien des Wiederkäuers können wegen der geringen Anzahl motiler Spermien bei diesen Temperaturstufen nicht als repräsentativ betrachtet werden. Beim Hengst wurde auch die Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien nur wenig von der Temperatur beeinflußt, aber auch hier war ein leichter Anstieg vorhanden.

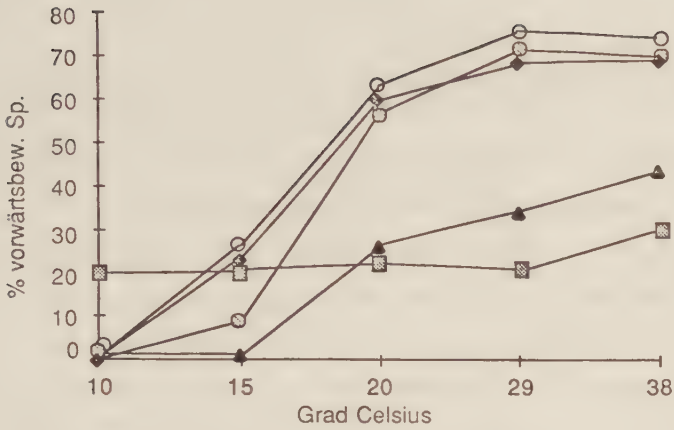


Abb. 3: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien bei verschiedenen Temperaturen ($\bar{x}$ aus je 5 Ejakulaten)

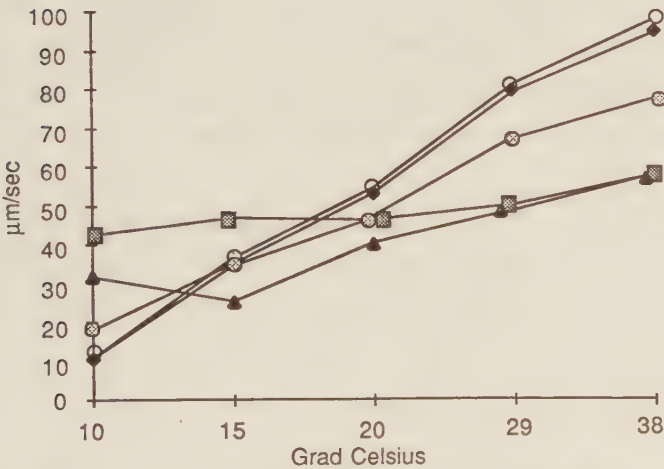


Abb.4: Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien bei verschiedenen Temperaturen ($\bar{x}$ aus je 5 Ejakulaten)

- ⊗ Bulle ○ Ziegenbock ▲ Eber
 ◆ Schafbock ■ Hengst

4.4. Einfluß des Tiefgefrierens

Das Tiefgefrieren reduzierte bei allen untersuchten Tierarten die Anzahl der vorwärtsbeweglichen Spermien hochsignifikant ($p < 0,001$; Tab. 18; Abb. 5). Am empfindlichsten zeigten sich die Spermien des Hengstes; nach dem Tiefgefrieren waren nur noch 14,2% der Zellen motil. Auch beim Schafbock verringerte sich die Anzahl vorwärtsbeweglicher Samenzellen von 69,1% auf 36,3%. Am widerstandsfähigsten zeigten sich die Spermien des Ziegenbocks und des Bullen.

Die Geschwindigkeit aller vorwärtsbeweglichen Zellen war nach dem Auftauen bei Schaf- und Ziegenbock hochsignifikant niedriger als vor dem Einfrieren ($p < 0,001$). Beim Bullen ist der Unterschied signifikant ($p < 0,01$), ebenso beim Hengst ($p < 0,05$).

Der Anteil geradlinig vorwärtsbeweglicher Spermien änderte sich beim Bullen und Ziegenbock nicht signifikant. Beim Schafbock erhöhte sich der Anteil von 91,7% auf 94,6% ($p < 0,05$), beim Hengst von 47,8% auf 70,0% ($p < 0,001$).

Tab. 18: Motilitätsparameter verschiedener Spezies vor und nach dem Tiefgefrieren ($\bar{x} \pm s$ aus je 5 Ejakulaten; pro Spezies 2 Individuen mit 2 bzw. 3 Ejakulaten)

Tierart		Prozentualer Anteil		$\mu\text{m/sec}$
		vorwärtsbew.	geradlinig	vorwärtsbew.
Bulle	vor TG	69,8 $\pm$ 11,7	92,2 $\pm$ 3,7	77,5 $\pm$ 5,9
	nach TG	48,4 $\pm$ 14,2	92,9 $\pm$ 4,5	72,7 $\pm$ 4,6
Schafbock	vor TG	69,1 $\pm$ 8,5	91,7 $\pm$ 3,5	94,8 $\pm$ 12,4
	nach TG	36,3 $\pm$ 11,6	94,6 $\pm$ 3,4	67,6 $\pm$ 7,0
Ziegenbock	vor TG	74,1 $\pm$ 9,0	93,5 $\pm$ 3,6	98,7 $\pm$ 7,0
	nach TG	51,6 $\pm$ 13,4	95,0 $\pm$ 2,3	85,8 $\pm$ 6,8
Hengst	vor TG	30,4 $\pm$ 9,2	47,8 $\pm$ 20,2	58,6 $\pm$ 9,3
	nach TG	14,2 $\pm$ 5,5	70,0 $\pm$ 16,0	55,0 $\pm$ 6,6

4.5. Einfluß von pH-Wert und Flüssigkonservierung

4.5.1. Bulle

Unterschiede von ± 1 im pH-Wert des Verdünners hatten wenig Einfluß auf die Motilität der Spermien, gemessen nach der Verdünnung. Bei dem ursprünglichen pH-Wert von pH 6,8 im CUE-Tris-Verdünner bewegten sich 66,9% der Spermien vorwärts, bei pH 5,8 67,0% und bei pH 7,8 65,9%. Es kam dabei aber zu unterschiedlichen Bewegungsformen. Bewegten sich bei pH 6,8 74,6% und bei pH 7,8 73,6% der motilen Spermien geradlinig vorwärts, so betrug deren Anteil bei pH 5,8 nur 49,6% (Tab. 19). Die durchschnittliche Geschwindigkeit aller vorwärtsbeweglichen Zellen stieg mit zunehmendem pH-Wert von 67,8 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei pH 5,8 auf 86,8 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei pH 7,8 (Tab. 20).

Nach einer 24-stündigen Lagerung bei $+5^\circ\text{C}$ waren alle Meßwerte signifikant niedriger als die Ausgangswerte ($p < 0,01$). Die Probe mit pH 6,8 wies die beste Motilität (43,3%) auf. Die Beweglichkeit im alkalischen Verdünner war stärker reduziert als die im Verdünner mit saurem pH-Wert. Der Anteil geradlinig vorwärtsbeweglicher Spermien war mit 49,6% am größten bei pH 7,8, die Standardabweichung dieses Wertes betrug 30,3 (Tab. 18). Die Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Samenzellen nach 24 Std. war mit 70,0 $\mu\text{m}/\text{sec}$ am höchsten bei pH 6,8. Die Geschwindigkeit von 41,3 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei pH 7,8 ist ein Durchschnittswert von nur 2,9% aller erfaßten Zellen und wird daher nicht berücksichtigt (Tab. 20).

Tab. 19: Motilitätsparameter im Sperma des Bullen nach Verdünnung mit pH 5,8, pH 6,8 und pH 7,8, gemessen nach 0 und 24 Stunden ($\bar{X} \pm s$ aus je 5 Ejakulaten; 2 von Bulle 1 und 3 Ejakulate von Bulle 2).

Parameter		pH 5,8	pH 6,8	pH 7,8
% V.	0 Std.	67,0 $\pm$ 13,5	66,9 $\pm$ 12,3	65,9 $\pm$ 14,6
	24 Std.	18,8 $\pm$ 10,9	43,3 $\pm$ 10,4	2,9 $\pm$ 2,3
		Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien = 100%		
% ger.	0 Std.	49,6 $\pm$ 21,4	74,6 $\pm$ 13,6	73,6 $\pm$ 17,5
	24 Std.	20,7 $\pm$ 13,4	16,0 $\pm$ 7,9	49,6 $\pm$ 30,3
% n. ger.	0 Std.	27,7 $\pm$ 12,0	14,4 $\pm$ 6,3	13,1 $\pm$ 6,2
	24 Std.	26,8 $\pm$ 13,8	24,5 $\pm$ 11,3	31,4 $\pm$ 28,7
% unph.	0 Std.	22,6 $\pm$ 14,5	10,9 $\pm$ 10,8	13,3 $\pm$ 14,4
	24 Std.	53,7 $\pm$ 18,7	59,5 $\pm$ 14,0	19,0 $\pm$ 27,6
% V.:		Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien		
% ger.:		Prozentsatz der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien		
% n. ger.:		Prozentsatz der nicht geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien		
% unph.:		Prozentsatz der unphysiologisch vorwärtsbeweglichen Sp.		

Tab. 20: Geschwindigkeiten ($\mu\text{m}/\text{sec}$) aller vorwärtsbeweglichen und der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien des Bullen, gemessen nach 0 und 24 Stunden ($\bar{X} \pm s$ aus je 5 Ejakulaten; 2 von Bulle 1 und 3 Ejakulate von Bulle 2).

Geschwindigkeit		pH 5,8	pH 6,8	pH 7,8
gesamt	0 Std.	67,8 $\pm$ 8,3	83,8 $\pm$ 10,7	86,8 $\pm$ 15,4
	24 Std.	64,8 $\pm$ 16,8	70,0 $\pm$ 13,6	41,3 $\pm$ 26,6
geradl.	0 Std.	76,6 $\pm$ 6,3	98,9 $\pm$ 31,0	98,0 $\pm$ 13,4
	24 Std.	87,2 $\pm$ 38,0	97,3 $\pm$ 36,1	42,0 $\pm$ 31,4

4.5.2. Schafbock

Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien unterschied sich in den 3 untersuchten pH-Stufen kaum (Tab. 21). Der Anteil geradlinig vorwärtsbeweglicher Samenzellen stieg jedoch mit zunehmendem pH-Wert von 68,4% bei pH 6,3 auf 91,6% bei pH 8,3. Auch die Geschwindigkeit war pH-abhängig, sie betrug 90,6 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei pH 6,3 und 126,0 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei pH 8,3.

Bei der Messung nach 24 Stunden hatte sich der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien bei einem pH-Wert von 6,3 hochsignifikant reduziert ($p < 0,001$), während er bei den pH-Werten 7,3 und 8,3 nahezu gleichblieb. Der Prozentsatz geradlinig vorwärtsbeweglicher Zellen war am größten bei pH 8,3, am kleinsten bei pH 6,3 (Tab. 20). Die Geschwindigkeit sank bei allen Proben signifikant ($p < 0,001$), mit 93,8 $\mu\text{m}/\text{sec}$ war sie am höchsten bei pH 7,3 (Tab. 22).

Tab. 21: Motilitätsparameter im Sperma des Schafbockes nach Verdünnung mit pH 6,3, 7,3 und 8,3, gemessen nach 0 und 24 Stunden ($\bar{X} \pm s$ aus je 5 Ejakulaten; 2 von Schafbock 1 und 3 von Schafbock 2)

Parameter		pH 6,3	pH 7,3	pH 8,3
% V.	0 Std.	69,2 $\pm$ 8,6	66,4 $\pm$ 12,3	66,9 $\pm$ 10,7
	24 Std.	54,4 $\pm$ 13,7	64,0 $\pm$ 12,0	58,6 $\pm$ 14,2
		Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien = 100%		
% ger.	0 Std.	68,4 $\pm$ 21,3	86,3 $\pm$ 8,6	91,6 $\pm$ 4,2
	24 Std.	35,8 $\pm$ 9,0	92,4 $\pm$ 4,9	95,4 $\pm$ 3,0
% n.ger.	0 Std.	24,7 $\pm$ 16,4	9,4 $\pm$ 6,4	5,6 $\pm$ 3,2
	24 Std.	45,0 $\pm$ 5,7	5,1 $\pm$ 3,7	2,7 $\pm$ 1,5
% unph.	0 Std.	6,9 $\pm$ 5,9	5,3 $\pm$ 3,6	2,8 $\pm$ 1,8
	24 Std.	19,2 $\pm$ 7,5	2,5 $\pm$ 2,0	1,9 $\pm$ 1,7
% V.:		Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien		
% ger.:		Prozentsatz der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien		
% n.ger.:		Prozentsatz der nicht geradlinig vorwärtsbeweglichen Sp.		
% unph.:		Prozentsatz der unphysiologisch vorwärtsbeweglichen Sp.		

Tab. 22: Geschwindigkeiten ($\mu\text{m}/\text{sec}$) aller vorwärtsbeweglichen und der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien des Schafbockes bei pH 6,3, 7,3 und 8,3, gemessen nach 0 u. 24 Stunden ($\bar{X} \pm s$ aus je 5 Ejakulaten; 2 von Schafbock 1 und 3 Ejakulate von Schafbock 2)

Geschwindigkeit		pH 6,3	pH 7,3	pH 8,3
gesamt.	0 Std.	90,6 $\pm$ 10,1	124,4 $\pm$ 10,8	126,0 $\pm$ 8,7
	24 Std.	56,8 $\pm$ 4,8	93,8 $\pm$ 7,4	88,2 $\pm$ 5,0
geradl.	0 Std.	96,0 $\pm$ 9,2	129,2 $\pm$ 10,4	130,7 $\pm$ 10,2
	24 Std.	63,0 $\pm$ 5,5	96,5 $\pm$ 6,7	90,1 $\pm$ 5,0

4.5.3. Ziegenbock

Der Anteil vorwärtsbeweglicher Zellen im Sperma des Ziegenbockes wurde von Schwankungen des pH-Wertes im Verdünner nicht signifikant beeinflusst. Mit steigendem pH-Wert des Verdünners reduzierte sich der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien von 77,4% bei pH 6,1 auf 73,4% bei pH 8,1 (Tab. 23). Wie schon dargelegt, ist die Bewegungsklassifizierung der vorwärtsbeweglichen Spermien des Ziegenbockes kritisch zu betrachten. Die sehr schnellen Spermien bei pH 7,1 und pH 8,1 wurden zum großen Teil als nicht geradlinig eingestuft. Schwammen bei pH 6,1 78,3% der vorwärtsbeweglichen Spermien geradlinig, so sank deren Anteil bei pH 7,1 auf 64,0% und bei pH 8,1 auf 39,8%. Die Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Samenzellen stieg von 119,1 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei pH 6,1 auf 133,4 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei pH 8,1 ($p < 0,005$; Tab. 24).

Der Verlust motiler Spermien durch die 24-stündige Lagerung war bei pH 8,1 am geringsten, hier bewegten sich noch 66,5% der Zellen vorwärts. Bei pH 7,1 und pH 6,1 sank ihr Anteil signifikant ($p < 0,001$; Tab. 23). Nach 24 Stunden war die Geschwindigkeit deutlich abgesunken ($p < 0,001$; Tab. 24), deshalb stieg bei pH 8,1 der Anteil geradlinig vorwärtsbeweglicher Zellen auf 67,0%. Dennoch war, absolut betrachtet, der Anteil geradliniger Spermien nach 24 Stunden am geringsten bei dem sauren pH-Wert von pH 6,1.

Tab. 23: Motilitätsparameter im Sperma des Ziegenbockes nach Verdünnung mit pH 6,1, 7,1 und 8,1, gemessen nach 0 und 24 Stunden ($\bar{x} \pm s$ aus je 5 Ejakulaten; 2 von Ziegenbock 1 und 3 Ejakulate von Ziegenbock 2)

Parameter		pH 6,1	pH 7,1	pH 8,1
% V.	0 Std.	77,4 $\pm$ 6,7	75,1 $\pm$ 11,4	73,4 $\pm$ 12,2
	24 Std.	62,8 $\pm$ 8,2	60,0 $\pm$ 15,0	66,5 $\pm$ 8,2
		Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien = 100%		
% ger.	0 Std.	78,3 $\pm$ 9,3	64,0 $\pm$ 14,8	39,8 $\pm$ 17,7
	24 Std.	31,8 $\pm$ 11,7	66,3 $\pm$ 13,9	67,0 $\pm$ 8,9
% n.ger.	0 Std.	15,9 $\pm$ 8,0	23,9 $\pm$ 10,2	39,8 $\pm$ 9,8
	24 Std.	38,3 $\pm$ 5,2	21,8 $\pm$ 7,0	22,8 $\pm$ 5,1
% unph.	0 Std.	5,8 $\pm$ 2,5	11,5 $\pm$ 5,9	21,0 $\pm$ 10,8
	24 Std.	30,0 $\pm$ 10,2	12,0 $\pm$ 8,0	10,2 $\pm$ 4,8
% V.:		Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien		
% ger.:		Prozentsatz der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien		
% n.ger.:		Prozentsatz der nicht geradlinig vorwärtsbeweglichen Sp.		
% unph.:		Prozentsatz der unphysiologisch vorwärtsbeweglichen Sp.		

Tab. 24: Geschwindigkeiten ($\mu\text{m}/\text{sec}$) aller vorwärtsbeweglichen und der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien des Ziegenbockes bei pH 6,1, 7,1 und 8,1, gemessen nach 0 u. 24 Stunden ($\bar{x} \pm s$ aus je 5 Ejakulaten; 2 von Ziegenbock 1 und 3 Ejakulate von Ziegenbock 2)

Geschwindigkeiten		pH 6,1	pH 7,1	pH 8,1
gesamt	0 Std.	119,1 $\pm$ 8,8	127,4 $\pm$ 11,3	133,4 $\pm$ 11,8
	24 Std.	85,2 $\pm$ 7,2	107,5 $\pm$ 6,5	102,7 $\pm$ 6,8
geradl.	0 Std.	126,7 $\pm$ 9,1	134,6 $\pm$ 11,3	136,0 $\pm$ 13,5
	24 Std.	94,5 $\pm$ 7,4	110,4 $\pm$ 6,9	106,3 $\pm$ 6,2

4.5.4. Hengst

Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien war mit 46,8% am größten bei einem Verdünner mit pH 5,7 und sank signifikant mit zunehmendem pH-Wert bis auf 29,8% bei pH 7,7 ($p < 0,001$; Tab. 25). Bewegten sich bei pH 5,7 nur 48,8% der vorwärtsbeweglichen Spermien geradlinig, so erhöhte sich ihr Anteil auf 64,2% bei pH 7,7.

Die durchschnittliche Spermengeschwindigkeit war mit 76,0 $\mu\text{m}/\text{sec}$ am höchsten bei pH 5,7, bei pH 7,7 betrug sie 69,7 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (Tab. 26).

Nach einer Lagerung von 24 Stunden hatte sich der Anteil motiler Spermien signifikant erniedrigt ($p < 0,001$). Die wenigen vorwärtsbeweglichen Spermien zeigten bei allen 3 pH-Stufen überwiegend unphysiologische Bewegungsformen. Der Prozentsatz geradlinig vorwärtsbeweglicher Samenzellen war auf 20,6% bei pH 7,7 und 25,4% bei pH 5,7 gesunken ($p < 0,005$; Tab. 25). Die nach 24-stündiger Lagerung gemessene Geschwindigkeit war bei allen untersuchten pH-Stufen signifikant niedriger als sofort nach der Verdünnung ($p < 0,001$). Bei pH 6,7 bewegten sich die Spermien mit 39,7 $\mu\text{m}/\text{sec}$ am schnellsten fort (Tab. 26).

Tab. 25: Motilitätsparameter im Sperma des Hengstes nach Verdünnung mit pH 5,7, 6,7 und 7,7, gemessen nach 0 und 24 Stunden ($\bar{x} \pm s$ aus je 5 Ejakulaten; 2 von Hengst 1 und 3 Ejakulate von Hengst 2)

Parameter		pH 5,7	pH 6,7	pH 7,7
% V.	0 Std.	46,8 $\pm$ 10,3	41,4 $\pm$ 10,3	29,8 $\pm$ 9,7
	24 Std.	1,5 $\pm$ 1,6	9,2 $\pm$ 5,6	7,2 $\pm$ 6,6
		Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien = 100%		
% ger.	0 Std.	48,8 $\pm$ 15,8	61,2 $\pm$ 14,5	64,2 $\pm$ 10,0
	24 Std.	25,4 $\pm$ 20,8	21,0 $\pm$ 17,0	20,6 $\pm$ 13,5
% n.ger.	0 Std.	34,1 $\pm$ 9,7	27,3 $\pm$ 9,5	26,0 $\pm$ 8,6
	24 Std.	9,0 $\pm$ 10,3	38,7 $\pm$ 6,2	24,2 $\pm$ 19,4
% unph.	0 Std.	17,1 $\pm$ 9,1	11,4 $\pm$ 8,3	9,7 $\pm$ 4,7
	24 Std.	37,2 $\pm$ 34,7	39,6 $\pm$ 17,2	39,0 $\pm$ 26,6
% V.: Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien				
% ger.: Prozentsatz der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien				
% n.ger.: Prozentsatz der nicht geradlinig vorwärtsbeweglichen Sp.				
% unph.: Prozentsatz der unphysiologisch vorwärtsbeweglichen Sp.				

Tab. 26: Geschwindigkeiten ($\mu\text{m}/\text{sec}$) aller vorwärtsbeweglichen und der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien des Hengstes bei pH 5,7, 6,7 und 7,7, gemessen nach 0 und 24 Stunden ($\bar{x} \pm s$ aus je 5 Ejakulaten; 2 von Hengst 1 und 3 Ejakulate von Hengst 2)

Geschwindigkeit		pH 5,7	pH 6,7	pH 7,7
gesamt	0 Std.	76,0 $\pm$ 8,9	74,5 $\pm$ 9,3	69,7 $\pm$ 9,4
	24 Std.	27,0 $\pm$ 21,6	39,7 $\pm$ 7,8	31,0 $\pm$ 16,5
geradl.	0 Std.	81,8 $\pm$ 11,8	80,8 $\pm$ 9,6	75,7 $\pm$ 11,2
	24 Std.	20,2 $\pm$ 29,6	37,2 $\pm$ 24,1	28,5 $\pm$ 22,3

4.5.5. Eber

Schwankungen von $\text{pH} \pm 1$ im Verdünner beeinflussten die Motilität von Eberspermien nur wenig ($p < 0,005$; Tab. 27). Der Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen betrug 41,2% bei pH 5,8, bei pH 7,8 sank er auf 35,1%. Der Anteil der Zellen mit geradliniger Bewegung war bei den 3 untersuchten pH-Stufen fast gleich.

Auch die Geschwindigkeit änderte sich kaum, sie betrug 48,2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ sowohl bei pH 5,8 als auch bei pH 6,8 und 46,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei pH 7,8 (Tab. 28).

Die Flüssigkonservierung bei $+15^\circ\text{C}$ über 24 Stunden reduzierte sowohl den Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien als auch deren durchschnittliche Geschwindigkeit signifikant ($p < 0,001$; Tab. 27 und 28). Eine Bewegungsklassifikation erscheint wegen der zu geringen Anzahl beweglicher Zellen nicht sinnvoll.

Tab. 27: Motilitätsparameter im Sperma des Ebers nach Verdünnung mit pH 5,8, 6,8 und 7,8, gemessen nach 0 und 24 Stunden ($\bar{x} \pm s$ aus je 5 Ejakulaten; 2 von Eber 1 und 3 Ejakulate von Eber 2)

Parameter		pH 5,8	pH 6,8	pH 7,8
% V.	0 Std.	41,2 $\pm$ 8,9	37,8 $\pm$ 7,1	35,1 $\pm$ 7,8
	24 Std.	3,5 $\pm$ 3,5	1,1 $\pm$ 1,2	0,4 $\pm$ 0,6
		Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien = 100%		
% ger.	0 Std.	25,9 $\pm$ 8,2	24,1 $\pm$ 9,0	24,1 $\pm$ 9,2
	24 Std.	23,4 $\pm$ 28,1	40,6 $\pm$ 44,5	18,7 $\pm$ 20,4
% n.ger.	0 Std.	40,1 $\pm$ 6,0	39,3 $\pm$ 7,5	35,3 $\pm$ 10,5
	24 Std.	26,4 $\pm$ 25,9	21,4 $\pm$ 30,5	29,6 $\pm$ 27,1
% unph.	0 Std.	34,0 $\pm$ 9,8	36,6 $\pm$ 13,6	40,6 $\pm$ 13,3
	24 Std.	50,2 $\pm$ 28,1	36,1 $\pm$ 37,7	11,6 $\pm$ 13,9

% V.: Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien

% ger.: Prozentsatz der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien

% n.ger.: Prozentsatz der nicht geradlinig vorwärtsbeweglichen Sp.

% unph.: Prozentsatz der unphysiologisch vorwärtsbeweglichen Sp.

Tab. 28: Geschwindigkeiten ($\mu\text{m}/\text{sec}$) aller vorwärtsbeweglichen und der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien des Ebers bei pH 5,8, 6,8 und 7,8, gemessen nach 0 und 24 Stunden ($\bar{x} \pm s$ aus je 5 Ejakulaten; 2 von Eber 1 und 3 Ejakulate von Eber 2)

Geschwindigkeiten		pH 5,8	pH 6,8	pH 7,8
gesamt	0 Std.	48,2 $\pm$ 4,5	48,2 $\pm$ 4,6	46,5 $\pm$ 4,1
	24 Std.	34,9 $\pm$ 9,8	29,0 $\pm$ 23,4	18,8 $\pm$ 23,4
geradl.	0 Std.	57,0 $\pm$ 10,0	56,8 $\pm$ 7,4	54,5 $\pm$ 7,9
	24 Std.	32,0 $\pm$ 25,4	17,8 $\pm$ 26,5	15,5 $\pm$ 27,9

4.5.6. Tierartlicher Vergleich

Zur Darstellung der speziesbedingten Unterschiede im Verhalten gegenüber pH-Veränderungen im Medium wurde der im unbehandelten Verdünner gemessene Wert gleich 100 gesetzt und die relativen Abweichungen der anderen Werte berechnet .

Bei allen untersuchten Tierarten war der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien am höchsten bei einem aziden pH-Wert und am niedrigsten bei einem alkalischen pH-Wert (Tab. 29). Am ausgeprägtesten war dies beim Hengst zu beobachten, während die Motilität beim Wiederkäuer relativ wenig von Schwankungen des pH-Wertes beeinflußt wurde.

Das Absinken der Vorwärtsbeweglichkeit nach 24-stündiger Lagerung war am stärksten bei Hengst und Eber, wobei das für den Eber günstigste Medium einen Wert von pH 5,7, das für den Hengst von pH 6,7 aufwies. Das Sperma der kleinen Wiederkäuer zeigte sich gegen die Lagerung am widerstandsfähigsten, der günstigste pH-Wert für Sperma des Ziegenbockes lag bei pH 8,1, für das des Schafbockes bei pH 7,3. Das Sperma des Bullen zeigte nach einer Lagerung von 24 Stunden nur bei pH 6,8 noch gute Motilität (Tab. 29).

Die Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien war bei den Wiederkäuern am größten in einem alkalischen und am niedrigsten in einem sauren Verdünner. Die Spermien von Hengst und Eber hin-

gegen zeigten ein umgekehrtes Verhalten (Tab. 30).

Bei der Messung nach 24 Stunden war die Geschwindigkeit bei allen Spezies deutlich gesunken. Dabei war beim Bullen der Geschwindigkeitsabfall am niedrigsten bei pH 6,8. Die Spermien der kleinen Wiederkäuer bewegten sich am schnellsten in einem alkalischen Medium vorwärts, die des Hengstes bei pH 6,8 und die des Ebers bei pH 5,8 (Tab. 30).

Tab 29: Relative Abweichung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien nach Veränderung des pH-Wertes im Verdünner, gemessen nach 0 und 24 Stunden. Die Meßwerte im unbehandelten Verdünner bei 0 Stunden wurden gleich 100 gesetzt.

Tierart		pH -1	pH 0	pH +1
Bulle	0 Std.	100,1	100	98,5
	24 Std.	28,1	64,7	4,3
Schafbock	0 Std.	104,5	100	100,7
	24 Std.	81,9	96,4	88,2
Ziegenbock	0 Std.	103,1	100	97,7
	24 Std.	83,6	79,9	88,5
Hengst	0 Std.	113,0	100	97,7
	24 Std.	3,6	22,2	17,4
Eber	0 Std.	109,0	100	92,9
	24 Std.	9,3	2,9	1,1

Tab. 30: Relative Abweichung der Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien nach Veränderung des pH-Wertes im Verdünner, gemessen nach 0 und 24 Stunden. Die Meßwerte im unbehandelten Verdünner bei 0 Stunden wurden gleich 100 gesetzt.

Tierart		pH -1	pH 0	pH +1
Bulle	0 Std.	80,9	100	103,6
	24 Std.	77,3	83,5	49,3
Schafbock	0 Std.	72,8	100	101,3
	24 Std.	45,7	51,4	70,9
Ziegenbock	0 Std.	93,5	100	104,7
	24 Std.	66,9	47,1	80,6
Hengst	0 Std.	102,0	100	93,6
	24 Std.	36,2	53,3	41,6
Eber	0 Std.	100,0	100	96,5
	24 Std.	72,4	60,2	39,0

5. Diskussion

Für die Befruchtungsfähigkeit von Spermien ist deren Beweglichkeit von entscheidender Bedeutung (MATHUR et al., 1986). Zum einen müssen die Samenzellen einen Teil der Strecke vom Ort ihrer Deponierung zur Tuba uterina durch Eigenaktivität zurücklegen, zum anderen erfolgt die Penetration der Eizelle mit einer nach der Kapazitation erhöhten Bewegungsintensität (PUSCH, 1985). Inwieweit der Anteil beweglicher Spermien in einem Ejakulat sowie die Form und Geschwindigkeit ihrer Bewegung die Fertilität beeinflussen, ist noch ungeklärt. Eine der Voraussetzungen zur Klärung dieser Fragen ist die objektive Messung verschiedener Motilitätsparameter. Die Ermittlung physiologischer Werte für Beweglichkeit und Geschwindigkeit trägt zu einer besseren Beurteilung der Spermaqualität bei.

Die computergesteuerte Videomikrographie (CVM) ermöglicht eine quantitative und qualitative Messung der Beweglichkeit sowie der Fortbewegungsgeschwindigkeit der Spermien. Die in der Literatur (JECHT und RUSSO, 1973; KATZ et al., 1985) beschriebenen Anforderungen an ein objektives Auswertungssystem werden von dem hier verwendeten System erfüllt. Der personelle und zeitliche Aufwand für den Meßvorgang ist gering. Die Anwendung dieses Systems beim Bullen wurde schon beschrieben (GSCHWEND, 1986).

Ziel dieser Arbeit war es, die Anwendbarkeit des CVM-Verfahrens bei der Spermauntersuchung von Bulle, Schafbock, Ziegenbock,

Hengst und Eber zu untersuchen. Dabei wurden tierartliche Unterschiede der Spermienmotilität sowie ihre Beeinflussung durch äußere Faktoren überprüft. Um die Ergebnisse auch quantitativ vergleichen zu können, wurden die vor der Auswertung am Computer einzustellenden Werte möglichst einheitlich gewählt. Lediglich Parameter zur Erkennung speziesspezifischer Unterschiede, wie die Größe des Spermienkopfes, wurden der jeweiligen Tierart angepaßt. Beim Hengst wurde wegen des besseren Kontrastes die Videoaufnahme im Hellfeld gewählt. Alle Ejakulate mußten vor der Untersuchung auf 50000-70000 Spermien/mm³ verdünnt werden, dazu wurde ein tierartspezifischer Verdünner verwendet. Der Verdünner für Hengstsperma mußte, um ein optisch klares Medium zu ergeben, vor der Zugabe zentrifugiert werden. Der Einfluß des Verdünnungsgrades konnte bei der einheitlich angestrebten Endkonzentration nicht berücksichtigt werden. Unter diesen Voraussetzungen war die computergesteuerte Auswertung bei allen untersuchten Tierarten möglich. Die für Motilität und Geschwindigkeit erhaltenen Werte zeigten eine gute Übereinstimmung mit den Angaben im Schrifttum.

Bei der Messung der verdünnten Proben bei +38°C wurden die Unterschiede in der Spermienbewegung der einzelnen Spezies deutlich. Das Sperma der Wiederkäuer wies in den vom Computer gemessenen Werten den höchsten Gehalt vorwärtsbeweglicher Spermien aller untersuchten Spezies auf, das des Ebers den niedrigsten. Da die Zuordnung der Spermien zu den ortsbeweglichen oder vorwärtsbeweglichen Zellen nach deren Geschwindigkeit erfolgt, erhebt sich die Frage, ob der Grenzwert vor der Auswertung nicht an die Bewe-

gungsform jeder Spezies adaptiert werden sollte . Für die sehr langsam vorwärtsbeweglichen Eberspermien würde eine Herabsetzung dieser Grenze zu einem höheren Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien und einem geringeren Anteil ortsbeweglicher Spermien in den Ergebnissen der Computerauswertung führen, was dem subjektiven Eindruck besser entspräche. In dieser Arbeit wurden die Grenzggeschwindigkeiten für die Gruppierung der Spermien in die verschiedenen Bewegungsformen einheitlich gewählt, weil nur dadurch ein direkter Vergleich dieser Parameter zwischen den Spezies möglich ist.

Betrachtet man die Fortbewegungsgeschwindigkeiten der untersuchten Spezies, so ist eindeutig erkennbar, daß die Geschwindigkeit bei den Wiederkäuern gegenüber Hengst und Eber höher ist. Möglicherweise liefert unter den Bedingungen, die in der Maklerkammer herrschen (kurzfristig nahezu anaerobe Verhältnisse), der anaerobe Stoffwechsel der Wiederkäuerspermien mehr Energie als der aerobe bei Hengst und Eber. Eine biologische Begründung für eine schnellere Fortbewegung der Spermien könnte im Ort der Samen-deponierung liegen. Wiederkäuer lagern bei der Kopulation das Sperma in der Vagina ab, Hengst und Eber hingegen im Uterus (GOETZE, 1949). Da die Cervix eine natürliche Barriere darstellt, benötigen die vaginal deponierten Spermien mehr Energie, um diese zu durchdringen. Bei Pferd und Schwein stellt der Cervixmucus kein Hindernis für die Spermienpassage dar (KATZ und OVERSTREET, 1979).

Die Einteilung der vorwärtsbeweglichen Spermien in "geradlinig", "nicht geradlinig" und "unphysiologisch vorwärtsbeweglich" kann ein wichtiger Indikator für die Beurteilung der Spermienbewegung sein. Die Samenzellen der Wiederkäuer und des Hengstes bewegten sich überwiegend geradlinig vorwärts, die des Ebers verteilten sich etwa zu gleichen Teilen auf die 3 Bewegungsformen. Die Kreisbewegungen des Ebers werden auf den hohen Anteil an Spermien mit abaxialem Schwanzansatz (MÜLLER und BRANDL, 1975) sowie Eigenheiten in der fibrillären Struktur (VAN DUIJN JR., 1966) zurückgeführt.

Die Meßgenauigkeit des Mikroprozessor-Bild-Analyse-Computers wurde durch Beimischung eines bekannten Anteils abgetöteter Spermien in einem "split-sample-Versuch" überprüft. Das dabei verwendete Schockgefrieren einer verdünnten Spermaprobe durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schien keine Änderung des Milieus zu verursachen. Durch Zumischen des auf diese Weise inaktivierten Samens zu einer unbehandelten Probe erhöhte sich der durch das CVM-Verfahren ermittelte Anteil unbeweglicher Spermien proportional. Bewegungsform und Bewegungsintensität im unbehandelten Samen wurden durch die Zumischung der schockgefrorenen Samenprobe nicht beeinflusst.

Der Einfluß der Temperatur auf die Bewegungsform und die Geschwindigkeit der Spermien wurde in einem Bereich von $+10^{\circ}\text{C}$ bis $+38^{\circ}\text{C}$ untersucht. Die Abkühlgeschwindigkeit der verdünnten Proben betrug ca. $0,3^{\circ}\text{C}/\text{Min.}$ und entsprach damit in etwa dem in der

Praxis des Tiefgefrierens von Bullensperma angewandten Verfahren (PAUFLER, 1974). Dabei wurden Beweglichkeit und Geschwindigkeit der Samenzellen in unterschiedlichem Maße betroffen. Während die Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien von $+38^{\circ}\text{C}$ bis $+10^{\circ}\text{C}$ nahezu linear abfiel, blieb der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien bis $+29^{\circ}\text{C}$ gleich oder stieg noch leicht an und sank dann zwischen $+29^{\circ}\text{C}$ und $+20^{\circ}\text{C}$ stark ab. Auch hier bestätigte sich, daß die beiden Parameter "Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien" und "Geschwindigkeit" in den untersuchten Temperaturbereichen nicht miteinander korreliert sind (RIEMKE, 1984). Möglicherweise ist die reversible Hemmung der Motilität eine Schutzfunktion zum Überleben in niedriger Umgebungstemperatur. Wird eine bestimmte Temperaturschwelle überschritten, sind alle lebenden Spermien beweglich, unabhängig von einer weiteren Temperaturerhöhung. Eine Ausnahme bilden die Spermien des Hengstes, die sich gegen die bei diesen Untersuchungen geprüften Umgebungstemperaturen unempfindlich in ihrer Beweglichkeit und der Fortbewegungsgeschwindigkeit zeigten. Ob dieses Verhalten eine biologische Bedeutung hat, oder wie weit es durch die Zusammensetzung des verwendeten Verdünnners beeinflusst wurde, kann durch diese Versuche nicht geklärt werden. Die Bewegungsform der vorwärtsbeweglichen Spermien war ebenfalls temperaturabhängig. Die gerichtete, geradlinige Bewegung ging bei niedrigen Temperaturen in eine ungerichtete, nicht geradlinige und schließlich unphysiologische Bewegung über. Im Schrifttum wurde über die enge Korrelation zwischen der Amplitude des Schwanzschlages mit der Bewegungsform und der Geschwindigkeit bei Spermien berichtet. In den Untersuchungen von RIKMENSPOEL (1984)

erhöhte sich die Stoffwechselrate der Spermien mit ansteigender Temperatur, wobei gleichzeitig die Amplitude des Spermienchwanzschlages kleiner wurde. Folglich erhöhte sich die Geschwindigkeit und die Bewegung wurde zunehmend geradliniger. Dieser Effekt war, wie bereits MAKLER et al. (1981) sowie VAN DUIJN und RIKMENSPOEL (1960) berichteten, auch in diesen Untersuchungen bei den Wiederkäuern und beim Eber zu beobachten.

Der Tiefgefrierprozeß reduzierte den Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien in einer Samenprobe. Dabei bestand ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der Beweglichkeit vor und nach dem Tiefgefrieren. Wenn auch die Unterschiede in der Verarbeitung (Zusammensetzung des Verdünners, Adaption) berücksichtigt werden müssen, so unterschied sich der Abfall in der Motilität doch zwischen den Tierarten deutlich. Dabei zeigten sich die Spermien des Hengstes am empfindlichsten. Der Anteil der geradlinig vorwärtsbeweglichen Spermien war bei allen untersuchten Tierarten nach dem Auftauen höher als vor dem Tiefgefrieren, beim Hengst war dieser Anstieg hochsignifikant ($p < 0,001$). Der Grund dafür könnte sein, daß die nicht geradlinigen und unphysiologischen Bewegungsformen Ausdruck einer Schädigung der Ultrastruktur von Spermien sind, die durch den Tiefgefriervorgang abgetötet werden. Die Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien war nach dem Auftauen beim Bullen und Hengst signifikant niedriger als vor dem Tiefgefrieren ($p < 0,05$), noch deutlicher war dieser Unterschied beim Schaf- und Ziegenbock ($p < 0,001$).

Zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes wurde dieser in den verwendeten Verdünnern modifiziert. Durch das bei Hengst und Eber geringe Verdünnungsverhältnis (1:1 gegenüber 1:20 beim Bullen und 1:50 beim kleinen Wiederkäuer) kam es bei diesen Tierarten zu geringeren pH-Verschiebungen im verdünnten Samen. Die hierbei erhaltenen pH-Werte lagen bei Hengst- und Ebersperma bei ca. 6,7, 7,1 und 7,6. Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien änderte sich durch die Verschiebung des pH-Wertes kaum, der Anteil der geradlinig vorwärtsbeweglichen Zellen nahm jedoch mit steigendem pH-Wert zu. Die Bewegungsform scheint ein empfindlicher Indikator für Veränderungen des Mediums zu sein, in dem sich die Spermien befinden. Wie schon bei den anderen Noxen deutlich wurde, traten mit zunehmender Schädigung vermehrt unphysiologische Bewegungen auf. Die durchschnittliche Geschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien war bei den untersuchten Wiederkäuerspezies im alkalischen Bereich höher als im sauren. Im Gegensatz dazu war bei den Spezies Pferd und Schwein eine Tendenz zu höheren Spermigeschwindigkeiten im sauren Bereich zu beobachten. Dabei ist zu berücksichtigen, daß durch das geringe Verdünnungsverhältnis bei Hengst und Eber der untersuchte pH-Bereich der Samenproben bei diesen Spezies sehr klein war. Die höheren Spermigeschwindigkeiten im alkalischen Bereich könnten durch eine vermehrte ATP-Spaltung durch das Enzym ATPase erklärt werden. Das Reaktionsoptimum der ATPase liegt bei pH 8,2 - 9,3 (MANN, 1964). In diesem Zusammenhang scheint interessant, daß der pH-Wert des Cervixmucus im Östrus auf Werte bis 8,4 ansteigt und somit den Spermien ein optimales Milieu bietet (TAMPION und

GIBBONS, 1963). Da ein hoher pH-Wert zu einer gesteigerten Fruktolyse und einer vermehrten Laktatbildung führt (MANN, 1964), wäre zu erwarten, daß sich die Anhäufung des Laktats nach einer 24-stündigen Lagerung hemmend auf die Beweglichkeit auswirkt. Eine ausgeprägte Empfindlichkeit gegen pH-Veränderungen im Laufe der Kurzzeitkonservierung (24 Std.) zeigte nur das Sperma des Bullen. Spermaproben dieser Spezies wiesen nur im neutralen Bereich nach 24-stündiger Lagerung noch eine zufriedenstellende Motilität auf. Der Einfluß der pH-Veränderungen auf die Konservierungsfähigkeit in verdünnten Spermaproben von Hengst und Eber kann nicht beurteilt werden, da die Spermien nach 24 Std. fast gänzlich immotil waren. Möglicherweise war die Adaptionszeit an die physiologische Temperatur für diese Spezies zu kurz bemessen. Spermien mit aerobem Stoffwechsel benötigen nach einer Periode der Anabiose eine Erwärmungsdauer und Sauerstoffzufuhr von 30 Minuten bis 2 Stunden, um ihren vollständigen Energieumsatz zu erreichen (AALBERS, 1961).

In den durchgeführten Versuchen war die Abhängigkeit der Bewegungsform bzw. des Anteils in den einzelnen Gruppen und der Geschwindigkeit von der Zusammensetzung der verwendeten Verdünner klar erkennbar. Eine besonders deutliche Abhängigkeit der Spermengeschwindigkeiten vom Medium zeigte sich bei den kleinen Wiederkäuern. Die Durchschnittsgeschwindigkeiten lagen bei Verwendung eines "Natriumzitrat-Verdünners" signifikant höher als bei einer Verdünnung mit Triladyl. Dieser Effekt kann sowohl mit der durch Glyzerinegehalt höheren Viskosität des Triladyl-Ver-

dünners als auch mit einer die Beweglichkeit und die Geschwindigkeit steigernden Wirkung von Natriumzitrat erklärt werden (ROSS et al., 1983). Beim Bullen war die Geschwindigkeit bei Verdünnung mit Triladyl, trotz Glyzeringehalt, höher als mit CUE-Tris. Hengstspermien bewegten sich in einem glyzerinhaltigen Verdünner wesentlich langsamer als in einem Verdünner mit gleicher chemischer Zusammensetzung, der kein Glyzerin enthielt.

In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die computer-gesteuerte Videomikrographie zur objektiven Erfassung von Motilitätsparametern in verdünnten Samenproben von Rind, Schaf, Ziege, Pferd und Schwein verwendet werden kann. Die untersuchten "Noxen" bewiesen einmal die Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit dieses Systems, Veränderungen in der Bewegungsform und -intensität nachzuweisen. Zum anderen kann für die Praxis der Samenuntersuchung und -konservierung gefolgert werden, daß alle hier untersuchten Motilitätsparameter von äußeren Faktoren unterschiedlich beeinflußt werden können. Dies bedeutet, daß zukünftig bei der andrologischen Diagnostik wie auch bei der Verarbeitung von Samenproben im Rahmen der künstlichen Besamung neben dem Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien und ihrer Bewegungsformen auch die Geschwindigkeit erfaßt werden sollte.

6. Zusammenfassung

Es wurde die Brauchbarkeit eines objektiven Verfahrens zur Bestimmung der Beweglichkeit und Geschwindigkeit von Spermien an verdünnten Samenproben von Bulle, Schafbock, Ziegenbock, Hengst und Eber überprüft.

Die verdünnten Spermaproben wurden bei 200-facher Vergrößerung im Phasenkontrast (beim Hengst im Hellfeld) mittels einer auf das Mikroskop montierten Kamera auf Videoband aufgenommen. Die Auswertung erfolgte durch den Mikroprozessor-Bild-Analyse-Computer "µBac 8810" (Version 1986; Fa. Brunner, München). Durch den Computer wird das Videobild in Digitaldaten transformiert und die Spermienbahnen in einer Bildsequenz verfolgt. Neben den Anteilen vorwärts-, orts- und unbeweglicher Zellen erfolgt eine Messung der Fortbewegungsgeschwindigkeit der vorwärtsbeweglichen Spermien sowie eine Einteilung derselben in verschiedene Bewegungsklassen.

Durch Zumischung definierter Anteile inaktivierter Spermien konnte belegt werden, daß die mit diesem Verfahren erhaltenen Werte eine gute Übereinstimmung mit den berechneten Werten aufwiesen.

Die Temperatur einer Spermaprobe während der Beurteilung wirkte sich entscheidend auf alle Motilitätsparameter aus. In einem Bereich von $+10^{\circ}\text{C}$ - $+38^{\circ}\text{C}$ erhöhte sich die Spermien Geschwindigkeit kontinuierlich, während der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher

Samenzellen jeweils in einem engen, tierartlich verschiedenen Temperaturbereich sprunghaft anstieg. Bei +10°C waren fast alle Samenzellen der untersuchten Spezies immotil, ausgenommen die des Hengstes, die sich gegen Temperatureinflüsse sehr resistent zeigten.

Der Tiefgefrierprozeß reduzierte bei den untersuchten Spezies den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien in größerem Maße als deren Geschwindigkeit.

Änderungen des pH-Wertes um ± 1 bei den zur Verdünnung der Samenproben verwendeten Pufferlösungen beeinflussten die untersuchten Motilitätsparameter nur geringfügig, wobei Tendenzen für speziesbedingte Unterschiede erkennbar wurden. Es ist anzunehmen, daß diese Veränderungen einer subjektiven Beurteilung entgangen wären.

Die Auswertung der Spermienbewegung mittels computergesteuerter Videomikrographie war bei allen untersuchten Spezies möglich. Die erhaltenen Werte entsprachen den Angaben in der Literatur. Die Ergebnisse der im Modell überprüften Einflüsse verschiedener Faktoren (Temperatur, pH-Wert) auf die Spermienmotilität belegen die Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit des hier eingesetzten Verfahrens.

7. Summary

Evaluation of sperm motility in domestic animals by a computer-assisted videomicrographic method

The aim of this work was to test the application of an objective method for the assessment of sperm motility in different species (cattle, horse, sheep, goat, pig). The influence of temperature, pH and semen preservation on sperm motility was examined and the results were compared among the above mentioned species.

The diluted sperm samples were recorded on videotape (200-fold magnification; stallion bright field illumination, all others phase contrast). A microprocessing image-analysing computer "µBAC 8810" (version 1986; Brunner, Munich) was used which digitalizes the video frames and traces the sperm cells in successive frames. According to their velocity, individual spermatozoa are classified into groups of forward, local- or non-moving cells. Moreover, specific movement patterns of forward moving spermatozoa can be differentiated. Reliability of this method was proved by adding varying quantities of killed spermatozoa to semen samples.

The temperature strongly effected the motility of sperm cells. From +10°C up to +38°C an almost linear increase of sperm velocity was observed; the results concerning the percentage of forward moving cells suggest that the activity of spermatozoa is stimulated within a narrow temperature range. At +10°C almost all

sperms of the species tested were immobile excluding those of the stallion, which tended to be resistant to the influence of lower temperatures.

The process of deep freezing reduced the percentage of forward moving sperms to a greater degree than their velocity.

Changes in the pH of the extender (± 1) did not influence the various parameters of motility significantly, yet trends for variations within species were recognized. It is assumed that these variations might have been missed by a subjective examination.

Sperm motility in domestic animals can be evaluated by computer assisted videomicrography. The results agree with those that are cited in the literature. With the aid of this technique various factors influencing sperm motility (temperature, pH and preservation) were examined. The results prove the sensitivity and reliability of this system.

8. Literaturverzeichnis

- AALBERS, J.G., T. MANN and C. POLGE (1961):
Metabolism of boar semen in relation to sperm motility and survival.
J. Reprod. Fertil. 2, 42-53
- AMANN, R.P. (1979):
Computerized measurements of sperm velocity and percentage of motile sperm.
in: The spermatozoon, 431-435, edited by D.W. Fawcett and J.M. Bedford, Verlag Urban und Schwarzenberg, Inc. Baltimore-Munich
- AMANN, R.P. and R.H. HAMMERSTEDT (1980):
Validation of a System for Computerized Measurements of Spermatozoal Velocity and Percentage of Motile Sperm.
Biol.Reprod. 23, 647-656
- AMANN, R.P. and M.T. O'CONNOR (1980):
Evaluation of spermatozoal motility by computer.
IX. Intern. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem., Madrid, Vol. 3, 431-435
- ATHERTON, R.W. (1975):
An objective Method for evaluating Angus and Hereford sperm motility.
Int. J. Fertil. 20, 109-112
- BAKER, F.N., R.G. CRAGLE, G.W.SALISBURY and N.L. VANDEMARK (1957):
Spermatozoan velocities in vitro.
Fert. Steril. 8, 149-155
- BARTOOV, B., D. BAR-SAGIE and A. MAYEVSKY (1980):
The effect of pH on ram sperm collective motility driven by mitochondrial respiration.
Int. J. Androl. 3, 602-612
- BARTOOV, B., D. KALAY and A. MAYEVSKY (1981):
Sperm Motility Analyzer (SMA), a practical tool of motility and cell concentration determinations in artificial insemination centers.
Theriogenology 15, 173-182
- BIELANSKI, W.F. (1975):
The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination.
J. Reprod. Fert., Suppl. 23, 19-24

BLACKSHAW, A.W. (1953):

The effects of potassium and calcium salts on the motility of ram, rabbit and bull spermatozoa.

J. Physiol. 120, 465-470

BLACKSHAW, A.W. and C.W. EMMENS (1951):

The interaction of pH, osmotic pressure and electrolyte concentration on the motility of ram, bull and human spermatozoa.

J. Physiol. 114, 16-20

CHANG, M.C. and A. WALTON (1940):

The effect of low temperature and acclimatization on the respiratory activity and survival of ram spermatozoa.

Proc. R. Soc. Lond. (Biol.) 129, 517

CRAIG, T., F.R. HALLETT and B. NICKEL (1982):

Motility analysis of circularly swimming bull spermatozoa by quasi-elastic light scattering and cinematography.

Biophys. J. 38, 63-70

COOKE, D.F. and F.R. HALLETT (1976):

Motility evaluation of bull spermatozoa by photon correlation spectroscopy.

J. Mechanochem. Cell Motility 3, 219-223

DENEHY, M.A. (1975):

The propulsion of nonrotating ram and oyster spermatozoa.

Biol. Reprod. 13, 17-29

DOTT, H.M. and G.C.A. FOSTER (1979):

The estimation of sperm motility in semen on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer.

J. Reprod. Fert. 55, 161-166

FUKUHARA, R. and Y. NISHIKAWA (1973):

Effects of pH, sperm concentration, washing and substrate concentration on respiration and motility of goat spermatozoa.

Jap. J. Zotech. Sci. 44, 266-270

GASSNER, F.X., J.W. GOLDZIEHER, J.F. MASKEN and M.L. HOPWOOD (1959):

The objective measurement of sperm motility.

Fert. Steril. 10, 488-501

GOETZE, R. (1949):

Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere.

Verlag M. und H. Schaper, Hannover

- GSCHWEND, H.-J. (1986):
 Untersuchungen über die Motilität von Bullenspermien,
 insbesondere über den Einfluß ihrer Geschwindigkeit auf das
 Befruchtungsvermögen.
 Vet. med. Diss., München
- HAEGER, O. und N. MÄCKLE (1971):
 Ein Zweiphasen-Verdüner in der Praxis der Schweinebesamung.
 Dtsch. tierärztl. Wschr. 78, 395-397
- HALLETT, F.R., T. CRAIG and J. MARSH (1978):
 Swimming speed distribution of bull spermatozoa as determined
 by quasi-elastic light scattering.
 Biophys. J. 21, 203-216
- JANICK, J. and J. MACLEOD (1970):
 The measurement of human spermatozoan motility.
 Fert. Ster. 21, 140-146
- JECHE, E.W. and J.J. RUSSO (1973):
 A System for the quantitative analysis of human sperm motility.
 Andrologie 5, 215-221
- JONDET, M., N.T. TEA et R. SCHOLLER (1983):
 Influence de la temperature sur la motilité des spermatozoïdes
 humains.
 Path. Biol. 31, 691-692
- JOUANNET, P., B. VOLOCHINE, P. DEGUENT, C.SERRES and G. DAVID
 (1977):
 Light scattering determination of various characteristic para-
 meters of spermatozoan motility in a series of human sperm.
 Andrologia 9, 36-49
- KATZ, D.F. and H.M. DOTT (1975):
 Methods of measuring swimming speed of spermatozoa.
 J. Reprod. Fert. 45, 263-272
- KATZ, D.F. and J.W. OVERSTREET (1979):
 Biophysical aspects of human sperm movement.
 in: The Spermatozoan, 413-420, edited by D.W. Fawcett and J.M.
 Bedford, Verlag Urban und Schwarzenberg, Inc. Baltimore-Munich
- KATZ, D.F. and J.W. OVERSTREET (1981):
 Sperm motility assessment by videomicrography.
 Fert. Steril. 35, 188-193
- KATZ, D.F., R.O. DAVIS, B.A. DELANDMETER and J.W. OVERSTREET
 (1985):
 Real-time analysis of sperm motion using automatic video
 image digitization.
 Comp. Meth. prog. Biomed. 21, 173-184

- KOH, S.H. and C.H. ONG (1976):
Comparison of storage motility of chilled goat semen extended in different diluents.
Kajian Veterinar 8, 25-28
- LARDY, H.A. and P.H. PHILLIPS (1943):
Effect of pH and certain electrolytes on the metabolism of ejaculated spermatozoa.
Amer. J. Physiol. 138, 741-746
- LARDY, H., B. WINCHESTER and P.H. PHILLIPS (1945):
The respiratory mechanism of ram spermatozoa.
Arch. Biochem. 6, 33-40
- LIU, Y.T. and P.K. WARME (1977):
Computerized evaluation of sperm cell motility.
Comp. biomed. Res. 10, 127-138
- MAKLER, A. (1979):
Simultaneous differentiation between motile, non-motile and dead human spermatozoa by combining supravital staining and multiple exposure photography procedures.
Int. J. Androl. 2, 39-42
- MAKLER, A. (1980a):
The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation.
Fert. Steril. 33, 337-338
- MAKLER, A. (1980b):
Use of a microcomputer in combination with the multiple exposure photography technique for human sperm motility determination.
J. Urol. 124, 372-374
- MAKLER, A., M. THATCHER and J. MOHILEVER (1980):
Sperm semi autoanalysis by a combination of multiple exposure photography (MEP) and computer techniques.
Int. J. Fertil. 25, 62-66
- MAKLER, A., M. DEUTSCH, A. VILENSKY and Y. PALTÍ (1981):
Factors affecting sperm motility VIII. Velocity and survival of human spermatozoa as related to temperatures above zero.
Int. J. Androl. 4, 559-56
- MANN, T. (1964):
XII. Influence of ion concentration, dilution, temperature and other extraneous factors on semen in vitro.
in: The Biochemistry of semen and of male reproductive tract, 339-364, Ed.: Mann, T., Methuen & Co. LTD., London

- MARTIN, J.C., E. KLUG and A. GÜNZEL (1979):
Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws.
J. Reprod. Fert., Suppl. 27, 47-51
- MASSANYI, L. (1977):
Telerecording record of spermatozoa.
Fol. Morphol. 15, 119-120
- MATHUR, S., M. CARLTON, J. ZIEGLER, P.F. RUST and H.O. WILLIAMSON (1986):
A computerized sperm motion analysis.
Fert. Steril. 46, 484-488
- MAYEVSKY, A., D. BAR-SAGIE and B. BARTOEV (1980):
Objective evaluation of fresh ram spermatozoan motility by reflectospermigraphic (RSG) system.
IX. Intern. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem., Madrid, Vol. 3, 149-152
- MOELLER, A.N. and N.L. VANDEMARK (1955):
In vitro speeds of bovine spermatozoa.
Fert. Steril. 6, 506-511
- MÜLLER, E. (1968):
Fotogrammetrische Untersuchungen über die Motilität verdünnter Rinderejakulate.
Wien. Tierärztl. Mschr. 55, 310-324
- MÜLLER, E. und G. BRANDL (1975):
Untersuchungen über die Motilität und Morphologie von Eberspermatozoen.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 82, 153-155
- MÜLLER, E. (1976):
Vergleichende Untersuchungen über die Motilität und Gesamtdehydrogenaseaktivität von Frischsamen und aufgetautem TG N2-Samen.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 83, 391-398
- NORMAN, C. and E. JOHNSON (1958):
Effect of pH on the lifespan and metabolism of bovine sperm kept at room temperature.
J. Dairy Sci. 41, 1803
- NYTKO, M. (1982):
Wpływ procesu konserwacji nasienia, ciśnienia osmotycznego oraz stężenia jonów wodowych (pH) na szybkość ruchu plemników ogiera
Med. Wet. 38, 81-85

- O'CONNOR, M.T., R.P. AMANN and R.G. SAAKE (1981):
Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility
with standard laboratory tests and their use for predicting
fertility.
J. Anim. Sci. 53, 1368-1376
- PAUFLE, S.K. (1974):
Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch.
Verlag Schaper, Hannover
- PHILLIPS, R.W. and F.N. ANDREWS (1937):
The speed of travel of ram spermatozoa.
Anat. Rec. 68, 127-132
- PLEWINSKA-WIERZBOWSKA, D. (1969):
Velocity of bull spermatozoa in vitro in different temperatures
of the environment.
Act. agr. Silvest., Ser. zoot. 9, 1-29
- PROVINCE, C.A., E.L. SQUIRES, B.W. PICKETT and R.P. AMANN
(1985):
Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended
equine spermatozoa.
Theriogenology 23, 925-934
- PUSCH, H.H. (1985):
Messung der Spermatozoenmotilität mittels Laser-Doppler-
Spektroskopie im andrologischen Routinelabor.
Andrologia 17, 217-223
- QUINN, P.J. and J.G. WHITE (1969):
Osmotic shock of ram spermatozoa.
J. Reprod. Fert. 18, 375-377
- RICKARD, H.E., T.M. LUDWICK, E.A. HESS and F.ELY (1957):
Activation of bovine spermatozoa by the use of sodium carbonate.
J. Dairy Sci. 40, 203-208
- RIEMKE, P. (1984):
Untersuchungen zur Motilitäts- und Geschwindigkeitsmessung von
Bullenspermien mit Hilfe der Videomikrographie.
Vet. med. Diss., München
- RIEMKE, P., J. BRAUN und W. LEIDL (1986):
Die Videomikrographie - eine Möglichkeit zur objektiven
Bestimmung der Motilität von Bullenspermien.
J. Vet. Med. A. 33, 541-550
- RIKMENSPOEL, R. (1957):
An optically clear egg-yolk diluent for bull spermatozoa.
Experientia 13, 124

RIKMENSPOEL, R. (1984):

Movements and active moments of bull sperm flagella as a function of temperature and viscosity.

J. exp. Biol. 108, 205-230

ROMBE, S.M. and T.L. SPIRIDONOVA (1972):

Determination of the velocity of spermatozoa with the aid of the Perfil'ev and gabe slit chamber and bacterial capillaries.

Sov. J. Dev. Biol. 3, 435-439

ROSENWINKEL, B. (1953):

Samenübertragung bei Ziegen. VI. Beitrag: Verdünnungs- und Besamungsversuche (Natrium-Citrat, Spermasol, Dilopten).

Vet. med. Diss., Hannover

ROSS, D.A., H.S. DHADWAL and J.A. FOULKES (1983):

Laser measurement of the motility of bull spermatozoa in an egg-yolk diluent.

J. Reprod. Fert. 67, 263-26

SAMUELS, J.S. and G. VAN DER HORST (1986):

Sperm swimming velocity as evaluated by frame lapse videography and computer analysis.

Arch. Androl. 17, 151-155

SCHILLING, E., J. JAZBEC und P. SCHMID (1967):

Größe und Geschwindigkeit der Samenzellen von Rind und Schaf und deren mögliche Beziehungen zum Geschlecht.

Z. Tierzücht. Zücht. Biol. 83, 331-339

SCHLEICHER, J. und G. BRÜCKNER (1973):

Ultrastrukturelle Befunde an flüssigkonservierten Schafbock-spermien bei Einsatz verschiedener Puffersubstanzen.

Mh. vet. med. 28, 391-395

SCHOEVERT-BROSSAULT, D. (1984):

Automated analysis of human sperm motility.

Comp. Biomed. Res. 17, 362-375

SCHUBÖ, W. und H.-M. UEHLINGER (1986):

SPSS-X -Handbuch der Programmversion 2.2..

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

SHIMIZU, H. and G. MATSUMOTO (1977):

Light scattering study on motile spermatozoa.

IEEE Trans. bio med. Eng. BME 24, 153-157

SWAN, M.A. (1969):

An equation relating the speed of ram spermatozoa to tail-wave parameters.

J. Anat. 104, 410 (abstr.)

TAMPION, D. and R.A. GIBBONS (1963):

Swimming rate of bull spermatozoa in various media and the effect of dilution.

J. Reprod. Fert. 5, 259-275

TISCHNER, M. (1979):

Evaluation of deep-frozen semen in stallions.

J. Reprod. Fert., Suppl. 27, 53-59

TSO, W.W., W.M. LEE, K.C. TSUI, Y.F. LAM and M.-Y.W. TSO (1980):

Assay of progressive motion of boar spermatozoa.

Arch. Andrology 4, 315-326

VAN DUIJN, C. and R. RIKMENSPOEL (1960):

The mean velocity and velocity distribution of normal bull spermatozoa of different hydrogen ion concentrations from photo-electric measurements.

J. Agric. Sci. 54, 300-309

VAN DUIJN, C., JR. (1966):

The relationship between ultrastructure and movement patterns of spermatozoa, studied in model experiments.

Proc. 5. Congr. Fert. Steril. Stockholm, 631-635

VAN HUFFEL, X.M., D.D. VARNER, K. HINRICHS, M.C. GARCIA,

P.J. STRZEMIENSKI and R.M. KENNEY (1985):

Photomicrographic evaluation of stallion spermatozoal motility characteristics.

Am. J. Vet. Res. 46, 1272-1275

WALL, R.J., D.R. HAGEN and R.H. FOOTE (1980):

Measurement of bull sperm motility and velocity.

in: Testicular Development, Structure and Function, 455-460, edited by A. and E. Steinberger, Raven Press, New York, 1980

WARNAWSKI, A.N. (1971):

Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen von Kälteschäden an Bullen- und Schafbocksperma.

Fortpfl. Haust. 7, 15-33

WEBER, A., F. FISCHERLEITNER und E. MÖLLER (1980):

Quantitative Untersuchungen über Motilitätsmerkmale von Eberspermatozoen.

Zuchthyg. 15, 145-153

Lebenslauf

Name: Iris Leonie Christine Schröppel

Geburtsdatum: 25.06.1960

Geburtsort: Bayreuth

Eltern: Sylvia Schröppel, geb. Pezold
Christian Schröppel, Regierungsdirektor i.R.

Grundschule: 1966 - 1970 an der Grundschule Neuenmarkt

Gymnasium: 1970 - 1979 am Caspar-Vischer-Gymnasium Kulmbach

Abitur: 27.06.1979

Studium: 1979 - 1984 an der tiermedizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Staatsexamen: 22.11.1984

Approbation: 08.02.1985

Herrn Professor Dr. W. Leidl danke ich für die Überlassung des Themas und die freundlich gewährte Betreuung.

Bei Herrn Professor Dr. Dr. K. Osterkorn bedanke ich mich für die Hilfe bei der Bewältigung der statistischen Auswertung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Braun, der mir jederzeit mit fachlichen Anregungen hilfreich zur Seite stand.

Allen meinen Kollegen am Oberwiesenfeld, insbesondere Frau Anke Lotze danke ich sehr herzlich für die tatkräftige Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Dissertation.

